

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE QUIMIOCINAS NAS
ALTERAÇÕES MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO
PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE (1-40) EM CAMUNDONGOS**

GISELLE FAZZIONI PASSOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de doutora em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis - SC

2009

PASSOS, Giselle Fazzioni. **Caracterização do envolvimento de quimiocinas nas alterações moleculares e comportamentais induzidas pelo peptídeo beta-amilóide (1-40) em camundongos.** Florianópolis, 2009. 139 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 16/03/2009

Estudos recentes sugerem que o acúmulo de células gliais ativadas em áreas cerebrais importantes no controle cognitivo desempenha papel fundamental na [inflamação] associada à [doença de Alzheimer]. No entanto, os mecanismos que regulam o acúmulo destas células na doença ainda são pouco compreendidos. No presente estudo, o bloqueio genético da quimiocina MIP-1 α ou do receptor CCR5 e o bloqueio farmacológico da enzima [PI3K γ] foram utilizados para avaliar o envolvimento de [quimiocinas] e suas vias de sinalização nas alterações moleculares e comportamentais induzidas pelo peptídeo [A β ₁₋₄₀]. Os dados do presente estudo demonstram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A β ₁₋₄₀ resultou no aumento dos níveis de RNAm para a MIP-1 α no hipocampo de camundongos, acompanhado por astrogliose e microgliose. De maneira importante, a deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5 resultou em redução do acúmulo de células da glia ativadas induzido pelo A β ₁₋₄₀ no hipocampo. O tratamento com o inibidor seletivo da PI3K γ , AS605240, apresentou efeito semelhante sobre o número de células gliais ativadas no hipocampo. O bloqueio genético da MIP-1 α ou do CCR5 e farmacológico da PI3K γ também inibiu a inflamação induzida pelo A β ₁₋₄₀ no hipocampo, como demonstrado pela redução da expressão das enzimas COX-2 e iNOS em camundongos com deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, ou da expressão da COX-2 em animais tratados com o AS605240. Todavia, tais efeitos ocorrem de maneira indireta, através da diminuição da migração celular, uma vez que macrófagos que não expressam CCR5, ou ainda macrófagos tratados com AS605240 apresentaram quimiotaxia reduzida, sem apresentar inibição da expressão de IL-1 β e TNF- α induzida pelo A β ₁₋₄₀. Por fim, o dano sináptico e cognitivo induzido pelo A β ₁₋₄₀ foi reduzido pela deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, ou pelo bloqueio farmacológico da PI3K γ . Em conjunto, estes dados apontam a MIP-1 α , o CCR5 e a PI3K γ como importantes mediadores da inflamação e dos prejuízos cognitivos induzidos pelo A β ₁₋₄₀, sugerindo que estas proteínas podem ser alvos terapêuticos potenciais no tratamento da doença de Alzheimer.

*"Além da mente humana e como um impulso livre,
cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as
gerações, frente a uma atividade que constitui o
melhor jogo do homo ludens: a ciência é, no mais
estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa
diversão"*

Jacques Barzun

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. João B. Calixto, por ter aberto as portas da carreira científica, pela orientação, pelo constante incentivo, apoio, confiança e pelo exemplo de competência e dedicação, que guardarei por toda a vida.

Ao meu noivo, Rodrigo Medeiros, meu companheiro na vida e na ciência. Seu amor, sua paciência e seu auxílio foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

À minha mãe, Terezinha Fazzioni, e ao meu irmão, Raphael Fazzioni Passos, exemplos de força e dedicação. Obrigada por todo o apoio, amor e paciência dedicados durante toda a minha vida.

Aos amigos Cláudia Figueiredo, Filipe Duarte, Pablo Pandolfo e Prof. Rui Prediger pelo auxílio na realização de inúmeros experimentos.

Ao Paulo Leal, pela síntese do composto AS605240, que foi fundamental para a realização de vários experimentos.

Aos queridos amigos Aline, Betinha, Cláudia, Ana Flávia, Eduardo, Juliana da Cunha, Kathryn, Martha, Maíra Bicca, Nara e Patrícia, pelo apoio e companheirismo em todas as horas. Sentirei muitas saudades dos dias que passamos juntos. Aprendi muito com todos vocês.

Aos colegas de pesquisa Alice, Allisson, Andrey, Dani Hara, Dani Leite, Denise, Diogo, Edinéia, Emerson, Flávia, Fernanda, Gecioni, Gustavo, Jarbas, Juliana Fabris, Juliana Chaves, Maíra Cola, Marianne, Rafael, Raquel, Ricardo, Robson, Stefânia, e demais colegas de outros laboratórios pela amizade, apoio e colaboração, que tornaram nossa convivência a melhor possível.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Farmacologia.

Aos professores André Ramos, Giles Rae, Jamil Assreuy, Leandro Bertoglio e Reinaldo Takahashi, por ter aceitado avaliar este trabalho, no momento da qualificação ou na defesa da tese. Agradeço, também, aos professores Cristoforo Scavone e Patricia Bozza, por terem se disponibilizado a participar da banca. Certamente, seus conhecimentos irão engrandecer este trabalho.

Ao CNPQ e à CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	18
Objetivo geral.....	18
Objetos específicos.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
Animais.....	20
Administração intracerebroventricular de β -amilóide.....	20
Síntese e administração do AS605240.....	21
Coleta dos tecidos.....	22
Extração de RNA total.....	23
Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.....	23
Preparação da fração de proteínas citoplasmáticas para imunodeteção de proteínas.....	25
Ensaio de imunodeteção (<i>western blot</i>).....	25
Análise histológica e imunoistoquímica.....	26
Obtenção de macrófagos peritoneais.....	29
Cultivo e ativação celular.....	30
Ensaio de viabilidade celular.....	31
Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i>	31
Labirinto Aquático de Morris.....	32
Teste do campo aberto.....	33
Drogas e reagentes.....	34
Análise estatística.....	34
RESULTADOS.....	36
Efeito do peptídeo A β_{1-40} sobre a expressão do RNAm para MIP-1 α e	

CCR5.....	36
Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de células gliais induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	38
Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 no aumento da expressão da iNOS e da COX-2 induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	42
Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de fatores de transcrição induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	45
Implicação da MIP-1 α e do CCR5 na migração e ativação celular <i>in vitro</i>	47
Papel da MIP-1 α e do CCR5 no dano cognitivo induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	51
Papel da MIP-1 α e do CCR5 na disfunção sináptica induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	55
Papel da via PI3K γ na ativação de células gliais induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	57
Envolvimento da via PI3K γ no aumento da expressão da COX-2 induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	59
Papel da via PI3K γ na migração e ativação celular <i>in vitro</i>	59
Envolvimento da via PI3K γ no dano cognitivo induzido pelo A β ₁₋₄₀	63
Papel da via PI3K γ na disfunção sináptica induzida pelo A β ₁₋₄₀	65
Envolvimento da via PI3K γ no dano cognitivo induzido pela escopolamina.	67
DISCUSSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS.....	120

LISTA DE ABREVIATÖES

Aβ	β -amilóide
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
AP-1	Proteína ativadora-1
APP	Proteína precursora amilóide
CCR	Receptor de quimiocina CC
CCR5^{-/-}	Animal com deleção gênica para o CCR5
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
COX	Ciclooxygenase
CREB	Elemento de resposta ao AMP cíclico
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAc	Ácido desoxiribonucléico complementar
D.O.	Densidade óptica
ELISA	Enzima imuno-ensaio
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GRO-α	Oncogene relacionado ao crescimento- α
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
i.c.v.	Intracerebroventricular
IκB	Proteína inibitória do NF- κ B
IKK	Proteína I κ B quinase

IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	Proteína indutível pelo interferon- γ -10
JAK	Janus quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Depressão de longo prazo
LTP	Potenciação de longo prazo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP	Proteína quimiotáctica de monócitos
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MIP-1$\alpha^{-/-}$	Animal com deleção gênica para a MIP-1 α
NF-κB	Fator nuclear- κ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PAK	Quinase ativada por p21
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PS	presenilina
PTX	Toxina pertussis
RANTES	Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RNA	Ácido ribonucléico

RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Transcrição reversa
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TNF	Fator de necrose tumoral
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito da administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a expressão do RNAm para MIP-1 α e CCR5 no hipocampo de camundongos.....	37
Figura 2 – Efeito do tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a ativação de células gliais no hipocampo de camundongos	40
Figura 3 – Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de células gliais no hipocampo de camundongos induzida pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀	41
Figura 4 – Efeito do tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a expressão de iNOS e COX-2 no hipocampo de camundongos	43
Figura 5 – Papel da MIP-1 α e do CCR5 na expressão de iNOS e COX-2 induzida no hipocampo de camundongos pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀	44
Figura 6 – Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de fatores de transcrição induzida no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀	46
Figura 7 – Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 na migração celular <i>in vitro</i>	49
Figura 8 – Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação celular <i>in vitro</i>	50
Figura 9 – Envolvimento da MIP-1 α no dano cognitivo induzido pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	53
Figura 10 – Envolvimento do CCR5 no dano cognitivo induzido pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	54

Figura 11 – Papel da MIP-1 α e do CCR5 no dano sináptico induzido pela administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	56
Figura 12 – Efeito do AS605240 sobre a ativação de células gliais induzida no hipocampo de camundongos pelo tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀	58
Figura 13 – Efeito do AS605240 sobre o aumento da expressão da COX-2 induzido no hipocampo de camundongos pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀	61
Figura 14 – Efeito do AS605240 sobre a migração e ativação celular <i>in vitro</i>	62
Figura 15 – Efeito do AS605240 sobre o dano cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	64
Figura 16 – Efeito do AS605240 sobre o dano sináptico induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	66
Figura 17 – Efeito do AS605240 sobre o dano cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos.....	68
Figura 18 – Aspectos celulares e moleculares envolvidos no dano cognitivo induzido pela A β ₁₋₄₀ em camundongos.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5 ^{-/-}	55
Tabela 2 – Efeito do tratamento com A β ₁₋₄₀ e/ou AS605240 sobre os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto.....	65

RESUMO

A doença de Alzheimer é caracterizada pela deposição do peptídeo β -amilóide ($A\beta$), associada à ativação do processo inflamatório e dano cognitivo nos indivíduos acometidos. Dados recentes sugerem que o acúmulo de células gliais ativadas em áreas cerebrais importantes no controle cognitivo desempenha papel fundamental no processo inflamatório associado à doença de Alzheimer. No entanto, os mecanismos que regulam a ativação e o acúmulo destas células na doença de Alzheimer ainda são pouco compreendidos. No presente estudo, o bloqueio genético da quimiocina proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α) ou do receptor de quimiocina CC 5 (CCR5), bem como o bloqueio farmacológico da enzima fosfoinositídeo-3-quinase γ (PI3K γ) foram utilizados para avaliar o possível envolvimento de quimiocinas e de suas vias de sinalização intracelular nas alterações moleculares e comportamentais induzidas pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$. Os dados do presente estudo demonstram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo $A\beta_{1-40}$ resultou no aumento tempo-dependente dos níveis de RNAm para a MIP-1 α no hipocampo de camundongos, acompanhado por aumento do número de astrócitos e células microgliais ativados. De maneira importante, a deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5 resultou em redução significativa do acúmulo de astrócitos e células microgliais ativados induzido pelo $A\beta_{1-40}$ no hipocampo. Além disso, o tratamento com o inibidor seletivo da PI3K γ , AS605240, apresentou efeito semelhante sobre o número de células gliais ativadas no hipocampo. O bloqueio genético da MIP-1 α ou do CCR5 e farmacológico da PI3K γ também inibiu a resposta inflamatória induzida pela injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ no hipocampo, como demonstrado pela redução da ativação dos fatores de

transcrição fator nuclear- κ B (NF- κ B), proteína ativadora-1 (AP-1) e elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), e da expressão das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em camundongos com deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, ou ainda da expressão da COX-2 em animais tratados com o AS605240. Todavia, tais efeitos ocorrem de maneira indireta, através da diminuição da migração celular, uma vez que macrófagos que não expressam CCR5, ou ainda macrófagos tratados com AS605240 apresentaram quimiotaxia reduzida *in vitro*, sem, no entanto apresentar inibição da expressão das citocinas interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) induzida pelo A β ₁₋₄₀. Por fim, o dano sináptico e cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ foi reduzido pela deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, ou ainda pelo bloqueio farmacológico da PI3K γ . Contudo, o tratamento com AS605240 não foi capaz de prevenir a amnésia induzida pela escopolamina. Em conjunto, os resultados do presente estudo apontam a MIP-1 α , o CCR5 e a via PI3K γ como importantes mediadores do processo inflamatório e dos prejuízos cognitivos induzidos pelo A β ₁₋₄₀, sugerindo que estas proteínas podem ser alvos terapêuticos potenciais no tratamento da doença de Alzheimer.

ABSTRACT

The hallmarks of Alzheimer's disease include the deposition of amyloid- β ($A\beta$) peptide, neuroinflammation and cognitive deficits. Glial cell activation and migration to cognitive-related areas seems to be critical for these alterations. However, so far, little is known about the mechanisms driving cell activation and accumulation during Alzheimer's disease. Herein we used the genetic deletion of the chemokine macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) or CC-chemokine receptor 5 (CCR5), or the pharmacological blockage of phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) as tools to address the possible role played by chemokines and its signaling pathways in molecular and behavioral alterations induced by intracerebroventricular (i.c.v.) injection of $A\beta_{1-40}$. A time-dependent induction of MIP-1 α mRNA was found in the hippocampus of $A\beta_{1-40}$ -treated mice, accompanied by accumulation of activated astrocyte and microglia. Notably, genetic deletion of MIP-1 α or CCR5 significantly reduced the number of activated astrocytes and microglia in the hippocampus following $A\beta_{1-40}$ administration. Moreover, the selective inhibitor of PI3K γ , AS605240 also inhibited $A\beta_{1-40}$ -induced activated glial cell accumulation in the hippocampus. The genetic blockage of MIP-1 α or CCR5 also resulted in a reduced activation of the transcription factors nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1) and cyclic AMP response element-binding (CREB), as well as a reduced upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Likewise, the COX-2 upregulation induced by $A\beta_{1-40}$ was found inhibited in AS605240-treated mice. Nevertheless, these effects on inflammation seems to be related to diminished cell migration, as macrophages obtained from mice lacking CCR5 or macrophages treated with AS605240 displayed impaired

chemotaxis *in vitro*, although tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) production in response to A β_{1-40} were unaffected. Finally, the cognitive deficits and synaptic dysfunction induced by A β_{1-40} was attenuated by the genetic deletion of MIP-1 α or CCR5 or by the pharmacological blockage of PI3K γ . Of note, AS605240 treatment failed to modify scopolamine-induced amnesia. Collectively, these results indicate that MIP-1 α , CCR5 and PI3K γ seems to exert a critical role for inflammation and cognitive failure induced by A β_{1-40} , thus suggesting these proteins as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment.

INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento populacional é um dos maiores triunfos da humanidade e também um dos nossos grandes desafios. Segundo o *National Institute on Aging* (NIA) dos Estados Unidos da América, em 2006 havia quase 500 milhões de pessoas no mundo com 65 anos de idade ou mais, e estima-se que até 2030 este número chegue a um bilhão de pessoas, representando um em cada oito habitantes (NIA, 2007). Este fenômeno foi observado inicialmente em países desenvolvidos, entretanto, mais recentemente, o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada nos países em desenvolvimento. No Brasil, o número de indivíduos idosos (65 anos de idade ou mais) passou de cerca de cinco milhões em 1980 para aproximadamente 10 milhões em 2000, sendo que em 2030 este número poderá atingir quase 30 milhões (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2000; 2008). Em países como a França, por exemplo, foi necessário mais de um século para que a população idosa dobrasse de tamanho (NIA, 2007). Estes números são o reflexo de avanços médicos, sociais e econômicos, que resultaram em um aumento expressivo da expectativa de vida da população. Contudo, eles também alertam para a possibilidade de crescimento do número de pessoas acometidas pelos chamados “males da idade”. Dentre estes, destaca-se a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer foi descrita inicialmente pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1906, durante o 37º congresso da Sociedade de Psiquiatras do Sudoeste Alemão, na cidade de Tübingen. Naquela ocasião, Alzheimer relatou o caso de Auguste D., uma paciente de 51 anos de idade que apresentava sintomas clínicos que incluíam perda progressiva da memória, desorientação, alterações de comportamento e deterioração da função da linguagem e cujo óbito

foi registrado 4,5 anos após a internação. Alzheimer descreveu ainda os aspectos anatomopatológicos da doença, sendo as principais características o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares e a perda neuronal (Selkoe, 2001; Goedert e Spillantini, 2006). Em 1910, na oitava edição do “*Handbook of Psychiatry*”, Emil Kraepelin, após estudar casos semelhantes, propôs o nome de doença de Alzheimer em homenagem ao seu descobridor (Maurer et al., 1997, Moller e Graeber, 1998). O termo doença de Alzheimer foi originalmente reservado para indivíduos que começavam a apresentar sintomas no período pré-senil, enquanto que a expressão demência senil era utilizada quando o início dos sintomas se dava após os 65 anos de idade. No final da década de 60 do século passado, Blessed, Tomlinson e Roth publicaram importantes estudos demonstrando que os achados anatomopatológicos característicos da então denominada doença de Alzheimer também estavam presentes em indivíduos com demência senil, representando assim uma única entidade patológica, e estabelecendo a doença de Alzheimer como a principal causa de demência no período senil (Blessed et al., 1968; Tomlinson et al., 1970). Estima-se que a doença represente entre 50–60% de todos os casos de demência (Blennow et al., 2006).

A prevalência da doença de Alzheimer apresenta aumento exponencial entre indivíduos idosos, passando de 1% aos 65 anos para aproximadamente 40–50% aos 95 anos de idade (Wang e Ding, 2008). Dessa forma, como resultado de mudanças demográficas e do aumento da expectativa de vida, espera-se que o número de indivíduos afetados pela doença cresça ao longo das próximas décadas, passando dos atuais 27 milhões para cerca de 107 milhões no ano de 2050, o que demonstra a relevância clínica, social e econômica da doença de

Alzheimer (Mount e Downton, 2006; Brookmeyer et al., 2007). Além do envelhecimento, que constitui o principal fator de risco relacionado à doença, outros fatores têm sido sugeridos com base em estudos epidemiológicos. Dentre estes, destacam-se baixa escolaridade, sedentarismo, traumatismo craniano, sexo feminino, depressão, hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, doença cardíaca coronariana, obesidade, diabetes, fumo e fatores genéticos (Ritchie e Lovestone, 2002; Mayeux, 2003; Gorelick, 2004).

Do ponto de vista genético, a doença de Alzheimer apresenta um caráter heterogêneo, com as formas familiar e esporádica descritas. A forma familiar da doença tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente se dá antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara (representa 5–10% do total de casos) (Poirier, 2005). Uma relação direta tem sido estabelecida entre a doença de Alzheimer familiar e a ocorrência de mutações em genes localizados nos cromossomos 21 (gene codificador da proteína precursora amilóide, APP), 14 (gene da presenilina 1) e 1 (gene da presenilina 2), enquanto interações complexas entre diferentes variantes genéticas e fatores ambientais parecem modular o risco para a grande maioria dos casos de doença de Alzheimer esporádica ou de início tardio (Kennedy et al., 2003; Lambert e Amouyel, 2007; Pastor e Goate, 2004). Dentre estes fatores genéticos, a presença de polimorfismo do gene que codifica a apolipoproteína E, alelo $\epsilon 4$ (presente no cromossomo 19), tem sido descrita como o principal fator de risco para a forma esporádica da doença, embora não se descarte a relevância do polimorfismo de outros genes, como os localizados nos cromossomos 12 (codificador da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) e 10 (gene *CALHM1*, codificador de um componente de um canal de

cálcio cerebral) (Corder et al., 1993; Strittmatter et al. 1993; Kang et al., 1997; Dreses-Werringloer et al., 2008).

A característica clínica proeminente da doença de Alzheimer é sua progressão ao longo do tempo. Inicialmente, ocorre prejuízo do aprendizado e memória de curto prazo, sem alteração em outras funções cognitivas. Em seguida, são observadas mudanças na memória de longo prazo, orientação e funções executivas como concentração e planejamento. Também podem ocorrer alterações na personalidade e no comportamento, tais como irritabilidade, ansiedade, agitação ou mesmo alucinações. Com a progressão da doença, é observada a deterioração da linguagem, habilidades visuo-espaciais e função motora (Teri et al., 1989; Clark, 2000; Petrella et al., 2003; Walsh e Selkoe, 2004). A sobrevida média dos pacientes após o diagnóstico inicial é de 5-10 anos, podendo chegar a 20 anos (Walsh et al., 1990).

Até o momento, não foram identificados marcadores biológicos ou sintomas clínicos precisos que permitam um diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer. Este só pode ser obtido com a demonstração de lesões neuropatológicas no tecido cerebral dos pacientes acometidos (Dickson, 1997). Neuropatologicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada por atrofia cortical difusa, perda massiva de células neuronais e sinapses, assim como presença de áreas com degenerações grânulo-vacuolares e um grande número de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (Mirra et al., 1991; Dickson, 1997; Markesbery, 1997; Braak et al., 1998; Iwatsubo, 2000). Os emaranhados neurofibrilares e as placas amilóides (também denominadas placas senis) são freqüentemente observados em tecidos cerebrais de indivíduos normalmente senis, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa quando comparado com o tecido cerebral dos

indivíduos portadores de doença de Alzheimer. Acredita-se que a concentração das placas senis esteja correlacionada ao grau de demência nos pacientes acometidos (Hardy e Higgins, 1992; Haass e Selkoe, 2007).

Os emaranhados neurofibrilares são agregados intraneuronais compostos pela proteína tau. Em condições fisiológicas, a proteína tau se apresenta na forma solúvel e promove a estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal, sendo esta função regulada por um processo de fosforilação e defosforilação. No entanto, em condições patológicas, como a doença de Alzheimer, as proteínas tau exibem hiperfosforilação, alteração na solubilidade, redução da afinidade pelos microtúbulos e formam estruturas filamentosas (Goedert et al., 1992; Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993; LaFerla e Oddo, 2005). Por sua vez, as placas amilóides são depósitos presentes no parênquima cerebral constituídos principalmente por peptídeos denominados β -amilóide ($A\beta$) (Glenner e Wong, 1984; Masters et al., 1985). Estes peptídeos, de 40 ou 42 aminoácidos, são formados a partir de uma glicoproteína transmembrana de maior peso molecular, a proteína precursora amilóide (APP), que sofre a ação das enzimas proteolíticas β - e γ -secretases (Haass, 2004; Gandy, 2005). A APP é primeiramente clivada na região amino terminal correspondente à $A\beta$ por uma protease integral de membrana com atividade β -secretase, chamada *β -site APP-cleaving enzyme-1* (BACE-1) (Vassar et al., 1999). Esta clivagem gera um grande derivado, a β -APP solúvel, e um fragmento carboxiterminal da APP que permanece ligado à membrana (β -CTF). A clivagem do β -CTF pela γ -secretase resulta na produção de $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$. A γ -secretase é um complexo intramembranoso formado por quatro componentes, que incluem a presenilina (PS), nicastrina, *anterior pharynx-defective phenotype-1* (APH-1) e *PS enhancer-2* (PEN-2), com a presenilina

constituindo o sítio ativo (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999). Essa via de metabolismo da APP recebe o nome de via β -secretase ou amiloidogênica, e pode ser observada também durante o metabolismo celular normal (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992). Na via α -secretase ou não-amiloidogênica, duas proteases com atividade α -secretase pertencentes à família *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) foram identificadas, ADAM-10 e ADAM-17 (Buxbaum et al., 1998; Lammich S, 1999). Essas enzimas presentes na superfície celular são responsáveis pela clivagem da APP em α -APP solúvel e no fragmento associado à célula α -CTF, que é subsequente clivado pela γ -secretase, gerando um peptídeo curto chamado p3 (Blennow et al., 2006). A ação da γ -secretase nas duas vias de metabolismo da APP também origina, além dos peptídeos A β ou p3, um fragmento chamado domínio intracelular da APP (AICD). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que o AICD está envolvido na regulação da expressão gênica e apoptose, o que poderia ser relevante na patologia da doença de Alzheimer (Müller et al., 2008; Słomnicki e Leśniak, 2008). Em condições normais, os peptídeos A β são degradados no cérebro pelas enzimas insulinsina, neprilinsina e pela enzima conversora de endotelina, além da enzima conversora de angiotensina e metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) (Iwata et al., 2001; Eckman et al., 2003; Farris et al., 2003; Turner et al., 2004; Nalivaeva et al., 2008). Outro mecanismo responsável pela remoção dos peptídeos A β do cérebro é um balanço entre o efluxo, mediado pela proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade, e o influxo, mediado pelo receptor para produtos finais da glicação avançada, dos peptídeos A β através da barreira hematoencefálica (Tanzi et al., 2004).

Diferentes hipóteses têm sido propostas para o processo neurodegenerativo observado na doença de Alzheimer. No entanto, evidências genéticas, clínicas e bioquímicas dão suporte à hipótese da cascata amilóide, que é considerada a hipótese central para a causa da doença (Selkoe, 2000; Hardy e Selkoe, 2002; Haass e Selkoe, 2007). De acordo com esta hipótese, o evento central na patogênese da doença é um desequilíbrio entre a produção e a remoção dos peptídeos A β , com produção aumentada destes peptídeos na forma familiar e redução de sua remoção na forma esporádica da doença. Como resultado, os peptídeos A β , em especial A β ₁₋₄₂, sofrem oligomerização e deposição, sendo que formas oligoméricas de A β são capazes de inibir de maneira direta a potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo e prejudicar a função sináptica (Walsh et al., 2002). As formas oligoméricas são capazes também de promover dano direto em sinapses, além de estimular a resposta inflamatória, alterações na homeostasia iônica neuronal e estresse oxidativo. Este processo compromete a função neuronal e sináptica, resultando em déficits na neurotransmissão e sintomas cognitivos. A formação de emaranhados neurofibrilares é considerada um evento paralelo, resultante de alterações na atividade de quinases/fosfatases, mas que também pode contribuir para a disfunção neuronal, morte celular e alterações cognitivas (Hardy e Selkoe, 2002; Mattson, 2004). Apesar da grande aceitação da hipótese da cascata amilóide, o papel das alterações da tau e dos peptídeos A β no desenvolvimento das alterações neuronais verificadas na doença ainda não é totalmente compreendido.

O tratamento da doença de Alzheimer inclui estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. As estratégias

farmacológicas utilizadas atualmente para o tratamento da doença se limitam ao aumento da disponibilidade de acetilcolina e ao bloqueio dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (Roberson e Mucke, 2006). A prevenção da degradação da acetilcolina com o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase tem mostrado eficácia na melhora da capacidade cognitiva e do comportamento de portadores da doença, uma vez que transtornos nos mecanismos de transmissão da acetilcolina e acetiltransferases ocorrem freqüentemente nos indivíduos afetados pela doença (Mattson, 2004). Já o bloqueio dos receptores NMDA com o uso de antagonistas seletivos é capaz de proteger os neurônios da excitotoxicidade mediada pelo glutamato (Mattson 2004; Blennow et al., 2006; Mount e Downton, 2006). No entanto, apesar dos efeitos apresentados pelos inibidores de acetilcolinesterase e antagonistas NMDA sobre a sintomatologia, estas drogas não são capazes de interferir de maneira marcante na degeneração neuronal, ou de reverter a progressão da doença de Alzheimer, o que ressalta a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Neste sentido, outras abordagens, denominadas por convenção de “terapias modificadoras da doença de Alzheimer” (*disease-modifying therapies*) têm sido avaliadas com o objetivo de interferir com mecanismos essenciais da doença. Entre as abordagens estudadas estão o bloqueio da síntese e agregação de A β , bem como o estímulo da remoção do peptídeo, além da inibição dos processos que levam à hiperfosforilação da proteína tau, dentre outras. A utilização destas terapias objetiva o retardo da morte neuronal, atenuando assim a progressão do processo degenerativo e a evolução para a demência (Schenk et al., 1999; McLaurin et al., 2002; Ritchie et al., 2003; Roberson e Mucke, 2006).

Avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à doença de Alzheimer são de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Os modelos animais têm contribuído consideravelmente para estes avanços, e têm um papel fundamental na avaliação de eventuais drogas com potencial terapêutico. Os modelos animais chamados de espontâneos consistem no uso de animais envelhecidos, que desenvolvem espontaneamente um conjunto de sintomas, dentre eles prejuízos sensoriais e cognitivos, semelhantes aos observados no decurso da doença, sendo que em roedores não é possível observar o desenvolvimento de placas amilóides ou emaranhados neurofibrilares (Van Dam e De Deyn, 2006). Nos modelos animais induzidos, são utilizadas ferramentas farmacológicas, ou então são produzidas lesões cerebrais para modular sistemas neurotransmissores implicados na patologia da doença (Ebert e Kirch, 1998; Toledano e Alvarez, 2004). Outro importante modelo induzido é a infusão intracerebral ou intracerebroventricular de peptídeos A β , que podem ser administrados agudamente, em uma única injeção, ou de maneira repetida, sendo que a administração contínua é a que melhor reproduz a lenta evolução da doença. Com o uso deste modelo, é possível observar alterações comportamentais, prejuízos cognitivos e alterações na transmissão colinérgica (Harkany et al., 1998; Nag et al., 1999; Nakamura et al., 2001). A administração intracerebral de A β é útil no estudo dos mecanismos envolvidos na toxicidade deste peptídeo e permite a avaliação pré-clínica de drogas. Contudo, as alterações neuropatológicas da doença de Alzheimer (placas amilóides e emaranhados neurofibrilares) não são observadas neste modelo (Van Dam e De Deyn, 2006). Os modelos animais transgênicos surgiram a partir da metade da década de 90 do século passado como uma valiosa ferramenta para o

estudo da doença de Alzheimer (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997; Götz e Ittner, 2008). Os modelos existentes atualmente incluem animais que expressam formas mutadas de genes que expressam APP, presenilina ou tau, ou ainda diferentes combinações destes genes (Van Dam e De Deyn, 2006; Götz e Ittner, 2008).

Além de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, é possível observar no cérebro de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer uma proeminente ativação do processo inflamatório. A presença de uma série de moléculas inflamatórias vem sendo demonstrada em cérebros afetados pela doença, incluindo proteínas do sistema complemento, citocinas e quimiocinas, além das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), dentre outras (McGeer e McGeer, 1995; Akiyama et al., 2000; McGeer e McGeer, 2001; Wyss-Coray 2006). O acúmulo de A β , a formação de emaranhados neurofibrilares e a neurodegeneração são eventos capazes de promover a ativação de células microgлияis e astrócitos, responsáveis pela produção da extensa lista de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos que podem contribuir para o dano neuronal progressivo associado à doença (Akiyama et al., 2000; Block e Hong, 2005). Corroborando esta idéia, estudos epidemiológicos sugerem que o tratamento prolongado com alguns antiinflamatórios não-esteroidais (ibuprofeno, indometacina e aspirina) é capaz de reduzir a incidência da doença de Alzheimer e melhorar os sintomas dos pacientes acometidos pela mesma (Rogers et al., 1993; McGeer et al., 1996; Stewart et al, 1997; Zandi et al., 2002).

As quimiocinas constituem um grande grupo de citocinas estruturalmente homólogas, cuja função principal é direcionar as células do sistema imune para os

sítios de inflamação (Luster, 1998). Até o momento, aproximadamente 50 quimiocinas diferentes já foram identificadas, sendo classificadas em quatro diferentes famílias com base no arranjo dos dois primeiros dentre quatro resíduos de cisteína conservados nos ligantes (Rollins, 1997; Murphy et al., 2000). Assim, a família CC (ou β) é formada por quimiocinas com os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes, enquanto que a família CXC (ou α) é caracterizada pela presença de um único resíduo de aminoácido entre as duas primeiras cisteínas. Na família CX3C (ou δ), três resíduos de aminoácidos separam as duas primeiras cisteínas. Por fim, a ausência de dois resíduos de cisteína caracteriza a família C (ou γ). No início da década, foi proposto um novo sistema de nomenclatura para as quimiocinas que usa o nome da família, indicando a classe a qual a quimiocina pertence, seguido pela letra “L” (designando ligante) e um número, correspondente ao já utilizado para designar o gene que codifica a quimiocina (Zlotnik e Yoshie, 2000). As quimiocinas exercem seus efeitos através da ativação de receptores acoplados à proteína G expressos na superfície celular, com 20 receptores diferentes conhecidos atualmente (Viola e Luster, 2008). Por sua vez, a nomenclatura dos receptores utiliza o nome da família de quimiocinas pela qual eles são ativados seguido da letra “R” (para receptor) e um número, correspondente a ordem cronológica em que eles foram identificados (Zlotnik e Yoshie, 2000). Os receptores de quimiocinas possuem sítios de ligação que podem ser específicos para um determinado agonista, entretanto, não é incomum o mesmo receptor ser alvo de ligação para várias quimiocinas da mesma família. Além disso, vários receptores parecem apresentar papel redundante, modulando as mesmas funções no organismo (Murphy et al., 2000; Charo e Ransohoff, 2006).

No sistema nervoso central, as quimiocinas regulam a migração de leucócitos através da barreira hematoencefálica, bem como a ativação e o movimento das células no parênquima cerebral, além de outras funções, que incluem a modulação da transmissão sináptica e também migração, proliferação celular e suporte trófico durante o desenvolvimento cerebral (Baggiolini, 1998; Cartier et al., 2005; Cardona et al., 2008). A expressão constitutiva de quimiocinas e seus receptores no sistema nervoso central é limitada, sendo observado um aumento expressivo nos níveis destas proteínas durante os processos inflamatórios e neurodegenerativos (Ransohoff et al., 1997; Jiang et al., 1998, McManus et al., 1998; Simpson et al., 1998; Westmoreland et al., 1998; Xia et al., 1998; Klein et al., 1999; Liu et al., 2007). De grande interesse, análises realizadas no tecido cerebral de pacientes com doença de Alzheimer revelaram aumento na expressão das quimiocinas e seus receptores, especialmente em áreas com acúmulo de placas amilóides (Xia et al., 1998; Akiyama et al., 2000). Foram verificados níveis aumentados dos receptores CCR1, CCR3, CCR5 e CXCR2, além de vários ligantes, incluindo a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, oncogene relacionado ao crescimento- α (GRO- α)/CXCL1, proteína induzível pelo interferon- γ -10 (IP-10)/CXCL10 e a proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1/CCL2 (Ishizuka et al., 1997; Horuk et al., 1997; Xia et al., 1998, 2000; Xia e Hyman, 2002; Halks-Miller et al., 2003; Cartier et al., 2005). Contudo, o número de estudos examinando a expressão e o papel das quimiocinas e seus receptores na doença de Alzheimer é pequeno, e o melhor entendimento acerca do papel exercido por estas proteínas na doença pode ser útil na determinação de novos alvos terapêuticos.

Dentre os 10 receptores CC caracterizados até o momento, um importante membro é o receptor CCR5, clonado e identificado inicialmente como o receptor para MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 e quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES)/CCL5 (Samson et al., 1996). Este receptor, que também tem como agonista a MCP-2/CCL8, está envolvido na migração de monócitos, células *natural killer* (NK) e linfócitos Th1, apresentando papel relevante no recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios (Charo e Ransohoff, 2006; Viola e Luster, 2008). Outras células que expressam o receptor incluem: células dendríticas, células endoteliais, neurônios, astrócitos e micróglia (Rottman et al., 1997; Mennicken et al., 1999; van der Meer et al., 2000; Viola e Luster, 2008). O receptor CCR5 passou a receber grande destaque há pouco mais de dez anos, a partir de sua identificação como o principal co-receptor para a infecção de células-alvo pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com tropismo por macrófagos (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996). Assim como a maioria dos retrovírus, o HIV é neurotrópico, e como resultado, vários sintomas neurológicos incluindo disfunções motoras e cognitivas ocorrem nos pacientes infectados e recebem o nome de demência associada ao HIV (Kolson et al., 1998). De fato, o bloqueio farmacológico do receptor CCR5 resulta em melhora nos sintomas cognitivos nestes pacientes (Heseltine et al., 1998). O envolvimento do CCR5 também é sugerido em outras condições neuropatológicas. Na esclerose múltipla, o CCR5 e seus ligantes foram detectados em macrófagos e células da glia em lesões ativas (Simpson et al., 1998; Balashov et al., 1999). Além disso, estudos genéticos indicam que indivíduos que possuem polimorfismo no gene que codifica o receptor ($\Delta 32$ CCR5) e resulta na abolição de sua expressão na superfície celular apresentam

retardo no início da doença, além de períodos de remissão mais longos em comparação a indivíduos que não apresentam o polimorfismo (Barcellos et al., 2000; Sellebjerg et al., 2000). Na doença de Alzheimer, é verificada a expressão aumentada do receptor CCR5 em células microgliais ativadas, e de dois de seus ligantes, MIP-1 α /CCL3 e MIP-1 β /CCL4, sendo o primeiro observado predominantemente em neurônios e células microgliais e o segundo predominantemente em astrócitos ativados (Xia et al., 1998).

Após a associação do ligante, os receptores de quimiocinas ativam proteínas G, levando a dissociação do heterotrîmero que constitui estas proteínas em suas subunidades α e $\beta\gamma$. A maioria das respostas mediadas pelas quimiocinas é inibida pela toxina pertussis (PTX), indicando que grande parte das proteínas G envolvidas nestas respostas pertence à família G_i (Goldman et al., 1985; Murphy 1994, Mellado et al., 2001). A ativação das proteínas G dá início a várias cascatas de sinalização paralelas, a maioria mediada pela liberação das subunidades $\beta\gamma$. A ativação da fosfolipase C- β leva à geração de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato, sendo o último capaz de promover a mobilização de Ca^{2+} intracelular através da ligação a receptores específicos presentes no retículo endoplasmático (Jiang et al., 1996). Agindo em conjunto com o Ca^{2+} , o DAG ativa diferentes isoformas da proteína quinase C, que por sua vez ativam outras cascatas de sinalização no citoplasma e núcleo da célula (Carnevale e Cathcart, 2003; Oppermann, 2004). Além disso, a ativação da via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), em especial da via envolvendo a quinase regulada por sinal extracelular (ERK)-1/2, vem sendo descrita para diferentes quimiocinas (Jones et al., 1995; Ganju et al., 1998; Tilton et al., 2000; Wang e Richmond, 2001). A ativação de outra quinase, a fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K), também

vem sendo amplamente documentada (Thelen et al., 1995; Turner et al., 1995; Sotsios et al., 1999; Tilton et al., 2000). Evidências apontam ainda que a ativação dos receptores de quimiocinas pode recrutar vias de sinalização intracelular independentes daquelas ativadas pelas proteínas G. Alguns receptores sofrem dimerização após a associação do ligante, um evento que inicia a ativação da via janus quinase-transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK-STAT) (Vila-Coro et al., 1999; Wong et al., 2001; Biswas e Sodhi, 2002; Wong e Fish 2003).

As PI3Ks pertencem a uma grande família de enzimas envolvidas na fosforilação de proteínas quinases intracelulares e de fosfoinosítídeos presentes na membrana celular (Vanhaesebroeck et al., 2001; Cantley, 2002). Através do processo de fosforilação dos seus substratos, as PI3Ks modulam várias funções celulares, que incluem crescimento, proliferação, sobrevivência, apoptose, adesão e migração celular (Foster et al., 2003). A família das PI3Ks está dividida em três classes, de acordo com características estruturais e funcionais (Vanhaesebroeck et al., 2001; Cantley, 2002, Foster et al., 2003). Nos últimos anos, as proteínas pertencentes à Classe I têm recebido especial atenção, principalmente pelo seu envolvimento nos processos neoplásicos e inflamatórios. Na Classe IA estão incluídas três enzimas, PI3K α , PI3K β e PI3K δ , que são ativadas por receptores do tipo tirosina quinase e parecem estar associadas com os mecanismos carcinogênicos em diferentes tipos celulares. Por outro lado, a PI3K γ é a única representante da Classe IB, e tem sua expressão restrita principalmente a leucócitos, embora a enzima também possa ser detectada no endotélio, coração e cérebro (Bernstein et al., 1998; Wetzker e Rommel, 2004). A PI3K γ é ativada por receptores acoplados à proteína G, e constitui a principal via de sinalização ativada pelos receptores de quimiocinas. Dessa forma, a PI3K γ vem sendo

diretamente relacionada com os fenômenos inflamatórios (Cantley, 2002; Rommel et al., 2007). Essa idéia tem sido reforçada por estudos conduzidos com animais com deleção do gene que codifica a PI3Ky. Estes animais apresentam migração defeituosa de neutrófilos (Li et al., 2000; Sasaki et al., 2000), macrófagos (Hirsch et al., 2000), linfócitos T (Reif et al., 2004) e células dendríticas (Del Prete et al., 2004) em resposta a agentes quimiotáticos. Além disso, a deleção do gene que codifica a PI3Ky conferiu proteção em modelos de inflamação pulmonar (Yum et al., 2001; Thomas et al., 2005), pancreatite (Lupia et al., 2004) e artrite reumatóide (Camps et al., 2005).

Nos últimos anos, um grande número de grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas tem explorado moléculas com potencial para inibir de forma seletiva a via da PI3Ky. Neste sentido, recentemente foi desenvolvida uma série de inibidores com grande potência e seletividade, destacando-se o AS605240 (5-quinoxilina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona) (Camps et al., 2005). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o AS605240 reduz o processo de migração celular induzido por vários agentes quimiotáticos, dentre eles a anafilatoxina C5a e a (MCP)-1/CCL2. Adicionalmente, o AS605240 apresentou importante atividade farmacológica quando administrado por via oral em modelos de artrite reumatóide, reduzindo o processo de migração leucocitária para o sítio inflamatório (Camps et al., 2005; Rommel et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados em um modelo de lúpus eritematoso sistêmico, onde a administração intraperitoneal do AS605240 reduziu a glomerulonefrite e aumentou o tempo de vida dos animais (Barber et al., 2005), e em modelos de aterosclerose, onde o bloqueio farmacológico da PI3Ky reduziu as lesões ateroscleróticas e a infiltração celular (Fougerat et al., 2008). Estes dados sugerem, portanto, que o bloqueio da via

PI3K γ poderia ser uma importante ferramenta terapêutica para o tratamento de patologias cujo processo de migração celular apresente papel significativo, incluindo a doença de Alzheimer.

O envelhecimento crescente da população mundial que vem ocorrendo durante as últimas décadas tem como reflexo o estabelecimento da doença de Alzheimer como um importante problema de saúde pública. O sofrimento humano e o alto custo econômico associados à doença de Alzheimer desencadearam uma busca sistemática de suas causas, bem como de novas estratégias terapêuticas. Considerando o importante papel exercido pelos peptídeos A β no desenvolvimento de várias alterações neuronais verificadas na doença de Alzheimer, o melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nas ações destes peptídeos pode ser útil no desenvolvimento de abordagens mais eficazes para o tratamento dessa patologia. Dessa forma, o presente estudo procurou avaliar a participação de quimiocinas, bem como de vias de sinalização intracelular envolvidas em suas respostas, no processo patológico induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A β_{1-40} em camundongos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da quimiocina proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α)/CCL3 e do receptor de quimiocina CC 5 (CCR5), bem como da enzima fosfoinosítídeo-3-quinase gama (PI3K γ), nas alterações moleculares e nos prejuízos cognitivos induzidos pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.

Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil temporal de expressão do RNAm para MIP-1 α e CCR5 no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, através da técnica de RT-PCR.
- Determinar o perfil temporal de ativação de células gliais no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, através da técnica de imunoistoquímica.
- Analisar a influência da deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, bem como do bloqueio farmacológico da via PI3K γ , na ativação de células gliais no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, através da técnica de imunoistoquímica.
- Verificar o perfil temporal de expressão das enzimas COX-2 e iNOS no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, através da técnica de *western blot*.
- Determinar o efeito da deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, bem como do bloqueio farmacológico da via PI3K γ , sobre a expressão das enzimas COX-2

e iNOS no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, através das técnicas de *western blot* e imunoistoquímica.

- Caracterizar o efeito da deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5 sobre a ativação dos fatores de transcrição fator nuclear- κ B (NF- κ B), proteína ativadora-1 (AP-1) e elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) induzida no hipocampo de camundongos pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, através da técnica de imunoistoquímica.
- Analisar a participação da MIP-1 α e do CCR5, bem como da PI3K γ , no aumento no processo de migração celular e produção das citocinas IL-1 β e TNF- α induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ *in vitro*, através da técnica de ELISA e do ensaio de quimiotaxia.
- Investigar o efeito da deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, bem como do bloqueio farmacológico da via PI3K γ , sobre o prejuízo cognitivo induzido pela injeção i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, através do modelo do labirinto aquático de Morris (versão de memória espacial de referência).
- Avaliar a participação da MIP-1 α e do CCR5, bem como da PI3K γ , no processo de dano sináptico induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ no hipocampo de camundongos, através da técnica de imunoistoquímica.
- Determinar a influência do bloqueio farmacológico da via PI3K γ no prejuízo cognitivo induzido pela injeção intraperitoneal (i.p.) de escopolamina, através do modelo do labirinto aquático de Morris (versão de memória espacial de referência).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos C57Bl6, nocautes para MIP-1 α (MIP-1 $\alpha^{-/-}$) ou nocautes para CCR5 (CCR5 $^{-/-}$) (20-30 g), criados no biotério setorial do laboratório do Prof. Dr. João B. Calixto (Depto. de Farmacologia, CCB, UFSC). A deleção da sequência codificadora dos genes para MIP-1 α (Cook et al., 1995) ou CCR5 (Kuziel et al., 2003) foi realizada de acordo com metodologias descritas em trabalhos da literatura. Os animais foram alojados em micro-isoladores Sealsafe IVC (TECNIPLAST, Buguggiate, VA, Itália) e mantidos sob controle de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (50-60%) em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e foram alimentados com ração Nuvilab CR-1 autoclavada (Nuvital Nutriente S/A, Colombo, PR, Brasil).

O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (*NIH Publication No. 85-23*, revisado em 1996). Os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC.

Administração intracerebroventricular de β -amilóide

O peptídeo A β_{1-40} (Tocris, Ellisville, MO, USA) e o peptídeo inverso A β_{40-1} (Bachem, Torrance, CA, USA) foram dissolvidos em tampão fosfato (PBS; 1 mg/ml) e incubados a 37°C por 4 dias, como descrito previamente (El Khoury et al., 1996). A forma agregada dos peptídeos A β (400 pmol/camundongo) ou a

solução veículo (PBS) foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) como descrito anteriormente (Laursen e Belknap, 1986; Medeiros et al., 2007). Para tanto, os animais foram anestesiados com isoflurano (1 ml/ml; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) através de um sistema de vaporização (SurgiVet Inc., Waukesha, WI, USA), e uma agulha 26 gauges de 3 mm de comprimento acoplada à uma microseringa (5 μ l; Hamilton, Reno, NV, USA) foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio eqüidistante entre os olhos e a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. Um volume de 3 μ l da solução contendo A β ₁₋₄₀, A β ₄₀₋₁ ou PBS foi injetado no ventrículo lateral, nas seguintes coordenadas a partir do bregma: anteroposterior (AP) = -0.1 mm, mediolateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral (DV) = -3 mm (Franklin e Paxinos, 1997). As soluções foram injetadas gradualmente durante um intervalo de 5 segundos. Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados e a correta inserção da agulha foi avaliada através de análise histológica.

Síntese e administração do AS605240

A fim de avaliar o envolvimento da PI3K γ nas alterações induzidas pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, foi utilizado o composto AS605240 (5- quinoxalina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona), sintetizado no departamento de química da UFSC. O AS605240 é um inibidor isoforma-seletivo da PI3K γ , apresentando uma seletividade 30 vezes maior para essa isoforma em relação à PI3K δ e PI3K β , e 7,5 vezes maior em relação à PI3K α (Camps et al., 2005). A síntese do inibidor foi realizada conforme descrito anteriormente (Ruckle et al., 2004a; Camps et al., 2005). O sal de potássio correspondente foi obtido a partir da seguinte via: 5-

quinoxalina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona foi suspenso em tetrahidrofurano, e em seguida foi adicionada uma solução de KOH (1N) em água (1.0 eq.). Foi obtida uma solução límpida, que após liofilização resultou no sal de potássio de 5-quinoxalina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona puro (Ruckle et al., 2004b).

O AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) foi dissolvido em PBS e administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀ e duas vezes ao dia (12/12 h) durante os dias consecutivos até a coleta dos tecidos ou realização de experimentos comportamentais. Em outra série de experimentos, os animais foram tratados com AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do antagonista muscarínico escopolamina (1 mg/Kg, i.p.). Grupos tratados com PBS foram utilizados como controle. A dose e os protocolos de tratamento do AS605240 e da escopolamina foram determinados com base em dados da literatura (Camps et al., 2005; Kim et al., 2007).

Coleta dos tecidos

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações moleculares após a administração do peptídeo A β ₁₋₄₀, alguns animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4°C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um microambiente gelado. Os hipocampus foram dissecados e em seguida armazenados em freezer a -70°C, até o momento do uso.

Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos hipocampus em 500 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). Foram adicionados 100 µl de clorofórmio ao homogeneizado, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (14.000 r.p.m., 15 min, 4°C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 µl de isopropanol. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (14.000 r.p.m., 15 min, 4°C), sendo o pellet resultante resuspenso em 500 µl de etanol gelado. Após centrifugação (10.000 r.p.m., 5 min, 4°C), o pellet contendo RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC; Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), sendo a concentração e a pureza determinadas em espectrofotômetro pela absorbância a 260 nm (A260) e pela razão das absorbâncias A260/A280, respectivamente. O RNA obtido foi estocado em freezer a -70°C até o momento do uso.

Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

A fim de determinar o efeito da administração i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para MIP-1α ou CCR5, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). Amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas em um volume final de 12,5 µl de reação constituído de tampão de primeira fita [ditiotretol (DTT) 10mM, MgCl₂ 3mM, KCl 75 mM e Tris-HCl 50 mM, pH 8,3], 0,05 µg de oligo dT primer, 2

U de inibidor de RNase, dNTPs (144 μ M), 50 U da enzima e água-DEPC para completar o volume. Para a obtenção do DNA complementar (DNAC) as amostras foram aquecidas por 5 min a 70°C, resfriadas a 4°C por 5 min e mantidas a 25°C durante a adição da enzima M-MLV. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37°C por 60 min, 70°C por 5 min e resfriadas a 4°C por 5 min. Foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase para promover a amplificação do DNAC para o MIP-1 α , CCR5 e β -actina. Para tal, os produtos de DNAC obtidos pela técnica de RT (2 μ l) foram amplificados utilizando enzima Taq DNA polimerase (5 U; Ludwig Biotec., Porto Alegre, RS, Brasil) em um tampão contendo Tris-HCl (10mM; pH 9,0), MgCl₂ (1 mM), dNTPs (200 μ M) e os *primers* específicos para MIP-1 α (sense, ATGAAGGTCTCCACCACTG; antisense, GCATTCAGTTCCAGGTCA), CCR5 (sense, GCCAGAGGAGGTGAGACATC; antisense, AAGAGCAGGTCAGAGATGGC) ou β -actina (sense, TCCTTCGTTGCCGGTCCACA; antisense, CGTCTCCGGAGTCCATCACA) de camundongo (300 nM), sendo o volume final de reação de 30 μ l. O PCR para β -actina foi utilizado como controle para confirmar a proporção na quantidade de RNA e DNAC nos experimentos. Quatro minutos após o preaquecimento a temperatura de 95°C, a mistura foi amplificada com 30 ciclos começando com um derretimento a 95°C por 30 s, anelamento a 54°C por 30 s (MIP-1 α e CCR5) ou 62°C por 30 s (β -actina), seguido por extensão a 72°C durante 1 min. A extensão final foi realizada por 5 min a 72°C. Os produtos finais do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida corado com sais de prata. Os géis foram digitalizados e analisados utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b.

Preparação da fração de proteínas citoplasmáticas para imunodeteção de proteínas

As amostras de hipocampo coletadas foram homogeneizadas com processador de tecidos (Tissue tearor; Biospec Products, INC., OK, USA) em tampão de lise A gelado [HEPES 10mM (pH 7,9), contendo: $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,5 mM, DTT 0,5 mM), NaF 50 mM, Na_3VO_4 2 mM, inibidor de tripsina 1,5 μ g/ml, pepstatina A 7 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml e aprotinina 10 μ g/ml]. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 15 min, agitadas vigorosamente por 15 min na presença de Triton-X100 (0.1%) e centrifugadas a 14.000 r.p.m., 30 min, 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato citoplasmático e armazenado em freezer a -70°C até o momento do uso. A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando kit Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), segundo recomendações do fabricante.

Ensaio de imunodeteção (western blot)

Proteínas previamente fracionadas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado [Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β -mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%], fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8–12%). Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de polivinilidenodifluorido (PVDF) (Hybond-P; GE Health care, São Paulo, SP, Brasil). A transferência foi efetuada em 2 h a 200 mA em tampão Tris-base 48 mM (pH 8,4), glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20%. As membranas de PVDF foram saturadas em solução de TBS-T contendo leite

desnatado (5%) por 2–4 h, a temperatura ambiente, mantidas nesta temperatura e então incubadas por intervalos de tempo apropriados com anticorpos primários para as proteínas de interesse: iNOS (1:200), β -actina (1:2000) (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) ou COX-2 (1:500; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL Plus) e filme radiográfico (Hyperfilm ECL) (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Os produtos finais foram digitalizados e analisados utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b.

Análise histológica e imunoistoquímica

A análise de imunoistoquímica foi realizada 6 h, 24 h ou 8 dias após o tratamento com o peptídeo A β ₁₋₄₀ em cérebros de camundongos. Para tal, os cérebros dos animais foram coletados após processo de perfusão com solução salina e paraformaldeído 4%, sendo mantidos nessa mesma solução durante 24 h. Posteriormente, foram realizadas secções coronais na região central do hipocampo, seguido de processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 3–4 μ m foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 1 h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinados através de imersões consecutivas em xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena

dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95–98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada utilizando os seguintes anticorpos: anti-*cluster of differentiation* (CD) 68 (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-sinaptofisina (1:400; Novocastra, Newcastle, Reino Unido), anti-proteína fibrilar ácida da glia (GFAP, 1:600), anti-fosfo-p65 NF-κB (1:100), anti-fosfo-CREB (1:200), anti-fosfo-c-Jun AP-1 (1:300) ou anti-COX-2 (1:200) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2–8°C, durante 12–16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado apropriado (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em câmara úmida durante 50 minutos à temperatura ambiente. As

lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi realizada com o uso de solução peroxidase-estreptavidina (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Após 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada com o uso de solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahidrocloro) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), seguida de contra-coloração em solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan; Merck, São Paulo, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, com abolição do anticorpo primário nas reações.

Os resultados foram obtidos através de uma câmera digital (Sight DS-5M-L1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Foram obtidas quatro imagens a partir de quatro cortes histológicos do hipocampo por camundongo (16 imagens/animal), sendo uma imagem para cada subregião do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e giro denteado). A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcagem (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a avaliação dos níveis de p-CREB e COX-2, os dados foram descritos como a porcentagem de área marcada (pixels positivos) dividida pela área total (pixels totais), conforme descrito previamente (Town et al., 2008). Para a análise dos níveis de sinaptofisina, a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade óptica (D.O.). A metodologia utilizada para avaliar o prejuízo sináptico utilizando a detecção dos níveis de sinaptofisina foi previamente validada em modelos experimentais de

neurodegeneração (Buttini et al., 1999) e em cérebros de humanos acometidos por doenças degenerativas (Masliah et al., 1992). A contagem de células positivas para CD68, GFAP, p-p65 NF- κ B ou p-c-Jun AP-1 foi realizada através de análise microscópica no aumento de 40 x em cada um dos quatro cortes histológicos do hipocampo. Os resultados foram expressos como a média do número de células positivas por corte histológico.

Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem C57Bl/6 (+/+), CCR5^{-/-} ou MIP-1 α ^{-/-}. Para tal, foi realizada assepsia com etanol 70% (v/v) da região cutânea abdominal, sendo esta removida para posterior administração de 10 ml de PBS (pH 7,4), que em seguida, foram aspirados com o auxílio de pipeta Pasteur de plástico. A suspensão contendo as células foi centrifugada a 1500 r.p.m. durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células re-suspensas em 500 μ l de meio RPMI 1640 suplementado com soro de bezerro 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 150 U/ml e estreptomicina 150 μ g/ml (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,1%; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), obtendo-se, em média, 98% de viabilidade. O número de células obtido da cavidade peritoneal foi determinado em câmara de Neubauer e os diferentes tipos celulares presentes foram avaliados através de análise morfológica em lâminas obtidas de alíquotas do lavado peritoneal, através de citocentrifugação e coloração pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Em média, as preparações continham 96% de células mononucleares com características morfológicas sugestivas de macrófagos.

Cultivo e ativação celular

O equivalente a 1×10^6 células foram semeadas em placas de 24 poços (Corning, São Paulo, SP, Brasil) e mantidas durante 1 hora à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ para permitir a adesão das mesmas. Após esse período, a monocamada de células aderentes foi lavada duas vezes com solução de PBS estéril pré-aquecida à 37°C para remoção das células não aderentes. Em seguida, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro de bezerro 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 150 U/ml e estreptomicina 150 µg/ml por pelo menos 12 h. Antes da adição de qualquer droga as células foram lavadas uma vez com meio de cultura RPMI 1640 na ausência de soro e mantidas por pelo menos 8 h em meio RPMI 1640 suplementado com soro de bezerro 0,5%.

Com o objetivo de determinar o envolvimento da MIP-1α ou do CCR5, ou ainda da PI3Ky no controle da produção de proteínas envolvidas na resposta inflamatória, macrófagos obtidos de animais da linhagem C57Bl/6 (+/+), CCR5^{-/-} ou MIP-1α^{-/-} foram estimulados durante 24 h com lipopolissacarídeo (LPS; 100 ng/ml), anafilotoxina C5a (10 nM), Aβ₁₋₄₀ (30 µM) ou Aβ₄₀₋₁ (30 µM). Em alguns experimentos, macrófagos obtidos de animais da linhagem C57Bl/6 foram estimulados conforme descrito acima na ausência ou na presença do AS605240 (0,1–10 µM). Após o período de incubação, o meio de cultura foi coletado para determinação dos níveis das citocinas interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) através de kit de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Parte do meio de cultura das células estimuladas com Aβ₁₋₄₀ ou Aβ₄₀₋₁ foi coletado e armazenado a -20°C para utilização nos experimentos de quimiotaxia.

Ensaio de viabilidade celular

Após a coleta do meio de cultura para análise dos níveis das citocinas, foi adicionado 250 µl de meio RPMI 1640 contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/ml). A seguir, as células foram incubadas por 3 h a 37°C. Após este período, o meio foi desprezado e os poços foram preenchidos com 250 µl de solução de dimetilsulfóxido. Após a centrifugação da placa, a 1200 r.p.m. por 8 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (EL808; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) em 550 nm. A viabilidade celular foi calculada considerando-se a absorbância do grupo controle como 100%.

Ensaio de quimiotaxia in vitro

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados utilizando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA). Alíquotas de 50 µl da suspensão de macrófagos (3×10^6 células/ml) obtidos de camundongos da linhagem C57Bl/6 (+/+), CCR5^{-/-} ou MIP-1 α ^{-/-} foram colocadas no compartimento superior da câmara e 27 µl do agente quimiotático colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de polivinilpirrolidona com poro de 5 µm (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA). Após incubação por 2 h à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, os filtros foram retirados, lavados com PBS, fixados com metanol (70%, v/v), corados com hematoxilina de Harris e montados sobre lâminas de vidro. A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático pelo meio RPMI 1640 suplementado com 0,5% de soro de bezerro. A migração dos macrófagos foi determinada pelo número de células que migraram completamente através do

filtro em 5 campos aleatórios, usando-se microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon) com objetiva de imersão. O índice de quimiotaxia foi determinado através do cálculo da razão entre o número de células que migraram para o compartimento contendo estímulo quimiotático e o número de células que migraram para o compartimento contendo meio RPMI 1640 (veículo).

Os agentes quimiotáticos utilizados neste experimento foram a anafilotoxina C5a (10 nM) ou o meio de cultura de células estimuladas com $A\beta_{40-1}$ ou com $A\beta_{1-40}$ (meio condicionado $A\beta$). Em alguns experimentos, o inibidor da PI3K γ , AS605240 (0,1-10 μ M), foi adicionado nos compartimentos superior e inferior da câmara de microquimiotaxia.

Labirinto Aquático de Morris

Os efeitos da administração i.c.v. dos peptídeos amilóides sobre a memória espacial de camundongos foram avaliados através do teste do labirinto aquático de Morris (Morris et al., 1982). O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), localizado no interior de uma sala com algumas pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água, sendo a temperatura da água mantida ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) através de um sistema automatizado de resistência. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). No interior do tanque (posição sudoeste) foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm), submersa 1 cm da superfície da água.

O protocolo experimental consistiu em uma sessão de treino e uma sessão de teste, conforme descrito anteriormente (Medeiros et al., 2007; Prediger et al.,

2008). Os animais foram submetidos à sessão de treino 30 min após a administração de escopolamina ou 7 dias após a injeção de A β ₁₋₄₀. As sessões de teste foram realizadas 24 h após o treino. Durante o treinamento os animais foram liberados para nadar até encontrar a plataforma ou até um período máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era conduzido manualmente até esta, onde permanecia por 10 s. O tempo (latência) até o animal encontrar a plataforma foi registrado. Após os 10 s sobre a plataforma, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 5 min, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. Este procedimento foi realizado 10 vezes na sessão de treino, sendo que os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória e a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após a sessão de treinamento, a plataforma foi removida do labirinto e os animais foram liberados para nadar (a partir da posição Norte) durante 60 s. Todos os experimentos realizados durante a sessão de teste foram gravados em sistema de DVDR 3455H (Philips, Manaus, AM, Brasil). As imagens foram posteriormente analisadas com o programa AnyMaze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) para determinação do tempo gasto no quadrante correto, velocidade de nado, distância percorrida e trajetória percorrida.

Teste do campo aberto

Para avaliar possíveis alterações locomotoras induzidas pela deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5, pelo tratamento com A β ₁₋₄₀ ou com AS605240, os animais foram testados no campo aberto 8 dias após os tratamentos. O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor preta (30 x 30 cm),

dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, com paredes transparentes de 15 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto por um período de 5 min. Todos os experimentos foram gravados em sistema de DVDR 3455H (Philips). O número de quadrantes cruzados e de atos de levantar foi registrado e tomado como índice de atividade motora.

Drogas e reagentes

Os seguintes reagentes e drogas foram utilizados: LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 0111:B4), escopolamina, Triton X-100, PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), aprotinina, leupeptina, pepstatina A, inibidor de tripsina, HEPES, DTT (ditiotreitól), tetrahydrofurano, KOH, NaF, Na₃VO₄, β-mercaptoetanol, MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], pastilhas de PBS (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil); Tris, acrilamida, glicerol e SDS (dodecil sulfato de sódio) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); oligo dT *primer*, inibidor de RNase, dNTPs (Promega, Madison, WI, USA); glicina (USB, Cleveland, OH, USA); anafilotoxina C5a (Bachem, Torrance, CA, USA); ácido cítrico, MgCl₂, KCl e NaCl (Merck, São Paulo, SP, Brasil); citrato de sódio, clorofórmio, isopropanol, etanol, metanol, acetona, xilol, peróxido de hidrogênio, dimetilsulfóxido, azul de bromofenol, paraformaldeído e nitrato de prata (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); corantes May Grünwald, Giemsa e hematoxilina de Harris (Newprov, Pinhais, PR, Brasil).

Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, adequadas ao protocolo experimental.

Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Bonferroni. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistica* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Efeito do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a expressão do RNAm para MIP-1 α e CCR5

A expressão aumentada de receptores para quimiocinas e seus ligantes em cérebros acometidos pela doença de Alzheimer vem sendo amplamente descrita. Dessa forma, visando avaliar o efeito do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a expressão de MIP-1 α e CCR5, os níveis do RNAm para ambas as proteínas foram avaliados no hipocampo de camundongos C57Bl6 (+/+) em diferentes períodos de tempo após o tratamento com A β ₁₋₄₀, através da técnica de RT-PCR. Em condições basais, o RNAm para o MIP-1 α é detectado no hipocampo. O tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) promoveu aumento rápido e tempo-dependente nos níveis do RNAm para a MIP-1 α , sendo que esse aumento ocorreu 1 h após, e pôde ser observado até 8 dias após o tratamento (Fig. 1A e B). A análise temporal demonstrou ainda que a expressão do RNAm para o CCR5 ocorre em condições basais no hipocampo, contudo a mesma não é alterada de maneira significativa pela administração de A β ₁₋₄₀ (Fig. 1A e C).

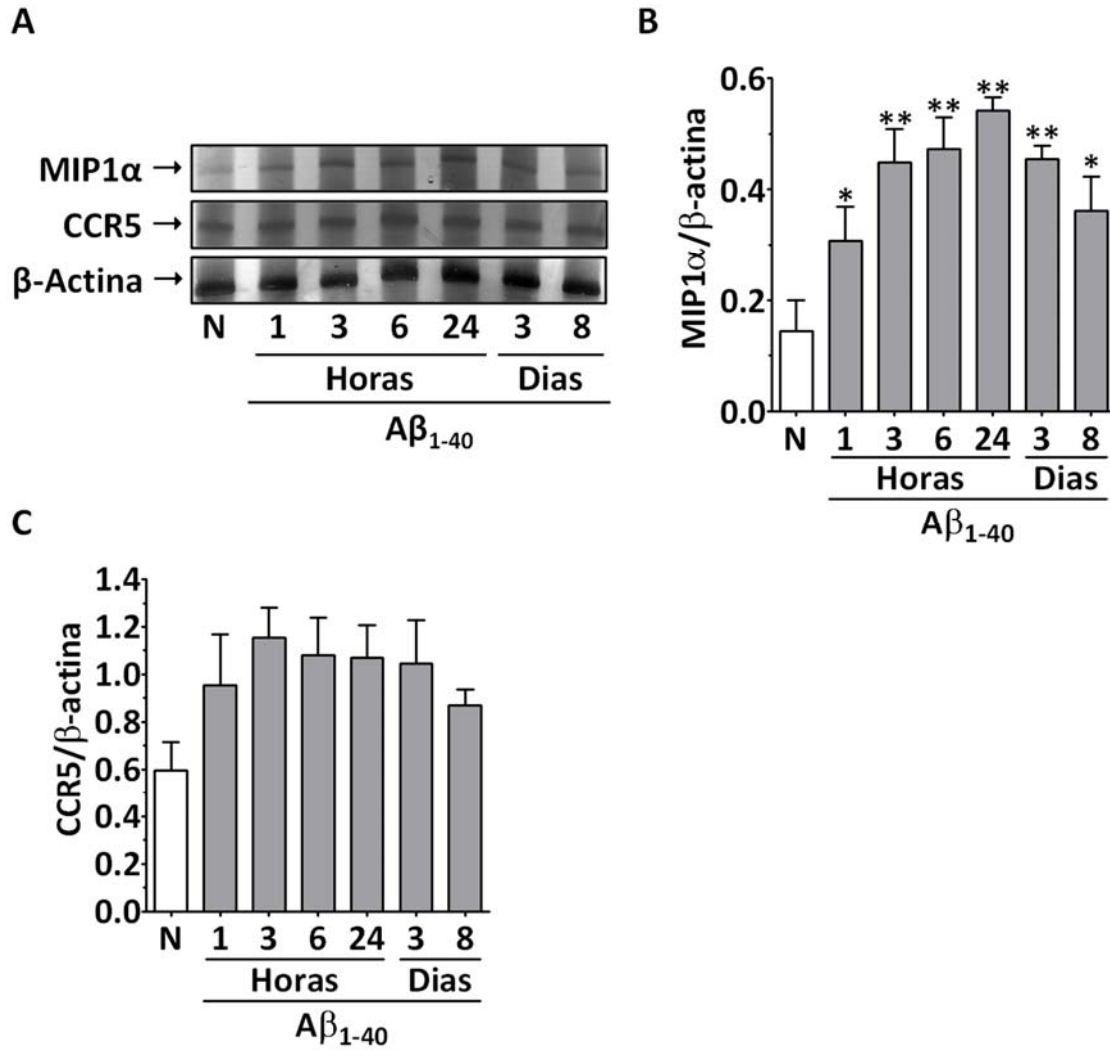


Figura 1 - Efeito da administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ sobre a expressão do RNAm para MIP-1 α e CCR5 no hipocampo de camundongos. Camundongos C57BL/6 (+/+) foram tratados com $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo, i.c.v.), e tiveram os hipocampus isolados após diferentes intervalos de tempo. Animais *naïve* foram utilizados como controle. O RNA total foi isolado para a avaliação da expressão do RNAm para MIP-1 α ou CCR5, e o RNAm para β -actina foi utilizado como controle. (A) Análise de RT-PCR representativa demonstrando a expressão de RNAm para MIP-1 α , CCR5 e β -actina. Representação gráfica da densitometria óptica dos produtos de RT-PCR para (B) MIP-1 α e (C) CCR5 normalizada pelos produtos para β -actina. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 3–5/grupo). *P < 0,05 e **P < 0,01 comparado ao grupo *naïve*.

Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de células gliais induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

Diferentes estudos sugerem que a doença de Alzheimer é uma patologia neuroinflamatória, caracterizada principalmente pela presença aumentada de células gliais ativadas no cérebro (Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray, 2006). Para verificar o efeito do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre a ativação de astrócitos e da micróglia no hipocampo dos animais C57Bl6 (+/+), foi avaliada a expressão de GFAP e CD68, respectivamente, através da técnica de imunistoquímica. Os dados apresentados na Figura 2 (A e C) demonstram que em condições basais o número de células positivas para GFAP é 16 ± 2 células por corte histológico. Por outro lado, a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) resultou em aumento significativo e dependente do tempo do número de células positivas para GFAP, sendo a resposta máxima observada 6 h após o tratamento (76 ± 6 células por corte histológico; aumento de 5 vezes), permanecendo significativa por até 8 dias (Fig. 2A e C). De maneira semelhante, o tratamento i.c.v. com o A β ₁₋₄₀ promoveu aumento significativo do número de células positivas para o CD68 após 24 h, atingindo níveis máximos 8 dias após o tratamento (59 ± 11 células por corte histológico; aumento de 15 vezes), quando comparado aos animais *naïve* (4 ± 1 células por corte histológico) (Fig. 2B e D). O tratamento com o fragmento amilóide inverso (A β ₄₀₋₁) não alterou o número de células positivas para GFAP ou CD68 em relação ao grupo *naïve* (Fig. 2).

O possível envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 no acúmulo de astrócitos e células microgliais ativados observado após o tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀ também foi avaliado. Os resultados do presente estudo demonstram que, em comparação com animais da linhagem C57Bl/6 (+/+), tanto a deleção gênica da MIP-1 α ,

quanto do CCR5, são capazes de prevenir significativamente o aumento do número de células positivas para GFAP no hipocampo, quando avaliado 6 h após a administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo) (Fig. 3A e C; inibição de 54% e 76%, respectivamente). Da mesma forma, o aumento do número de células positivas para o CD68, observado 8 dias após o tratamento com $A\beta_{1-40}$, foi quase que totalmente abolido nos camundongos $MIP-1\alpha^{-/-}$ ou $CCR5^{-/-}$, quando comparado a camundongos da linhagem C57Bl/6 (+/+) (Fig. 3B e D; inibição de 87% e 98%, respectivamente). Estes resultados sugerem, portanto, que a ativação do receptor CCR5, principalmente pela $MIP-1\alpha$, constitui um evento crucial para o acúmulo de astrócitos e células microgliais ativadas induzido pelo $A\beta_{1-40}$ no hipocampo de camundongos.

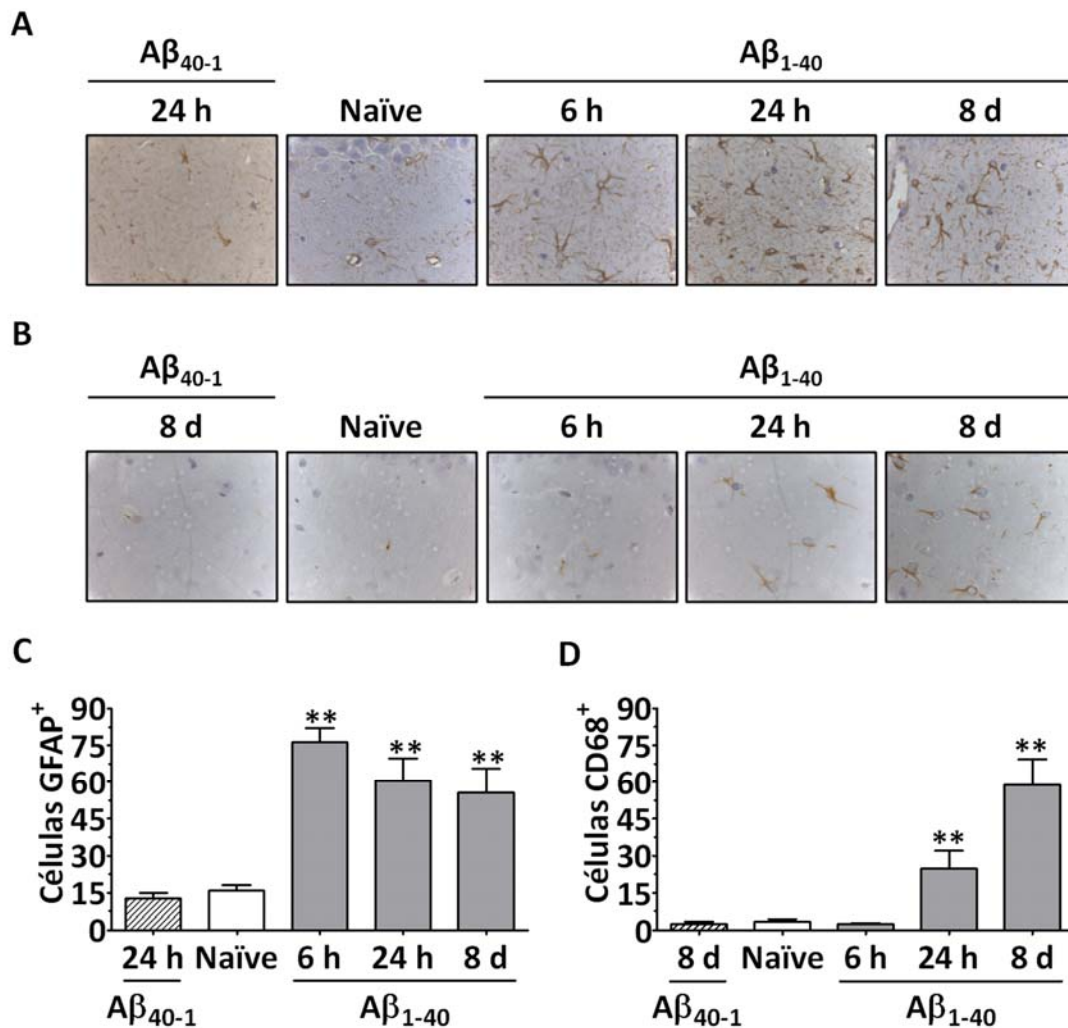


Figura 2 – Efeito do tratamento i.c.v. com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ sobre a ativação de células gliais no hipocampo de camundongos. A análise imunoistoquímica para GFAP e CD68 foi realizada em diferentes intervalos de tempo após a injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{40-1}$ (400 pmol/camundongo) em camundongos C57Bl/6 (+/+). Animais *naïve* foram utilizados como controle. A contagem de células positivas foi realizada por meio de inspeção visual no aumento de 40 x em quatro cortes histológicos do hipocampo utilizando microscópio óptico. Imagens representativas da imunomarcação para (A) GFAP ou (B) CD68 na subregião CA1 (aumento: 100 x). Representação gráfica do número de células positivas para (C) GFAP e (D) CD68 determinado em cada um dos cortes histológicos do hipocampo. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo *naïve*.

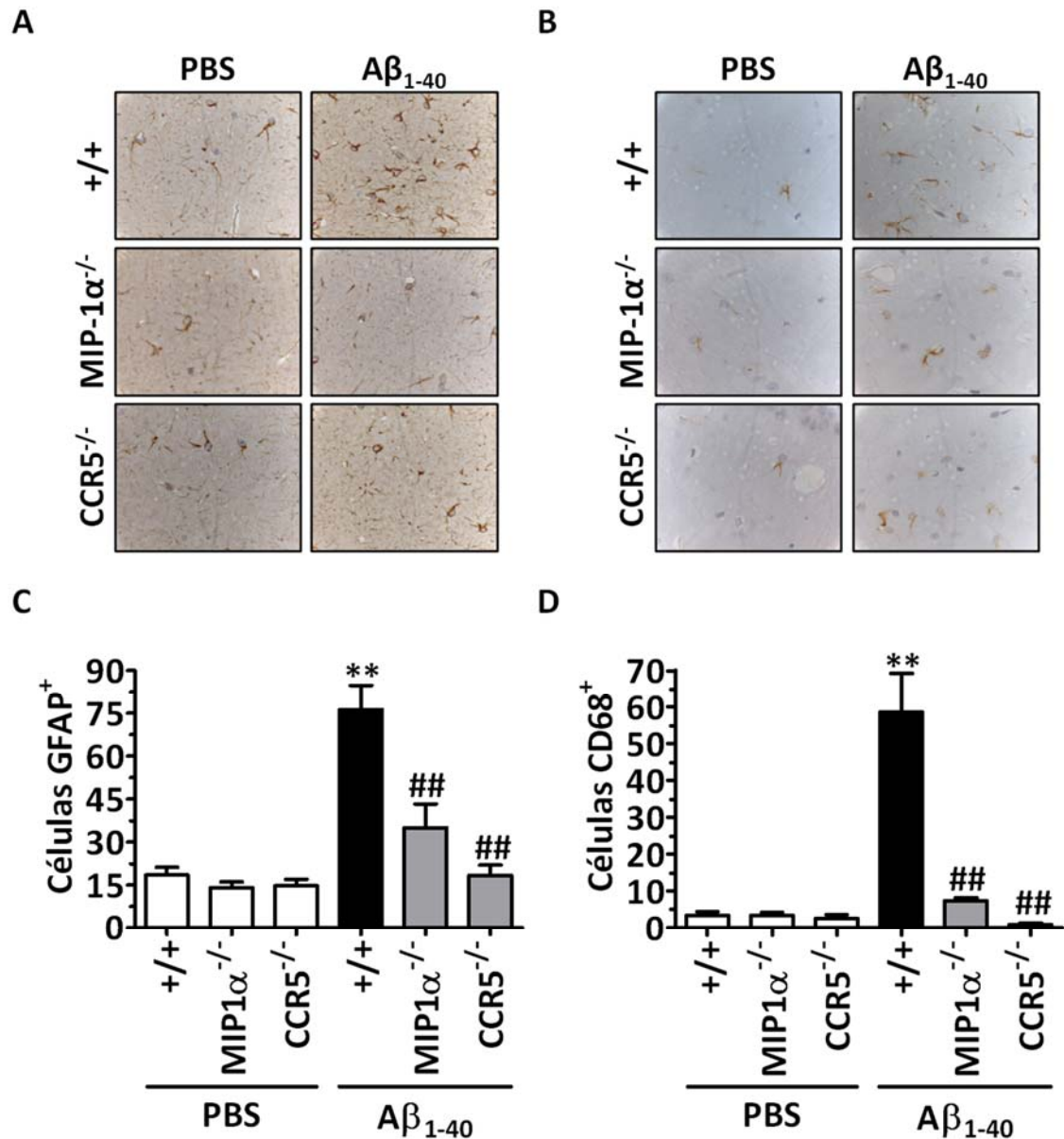


Figura 3 – Envolvimento da MIP-1α e do CCR5 na ativação de células gliais no hipocampo de camundongos induzida pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀. A análise imunoistoquímica para GFAP e CD68 foi realizada 6 h ou 8 dias após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS), respectivamente. A contagem de células positivas foi realizada por meio de inspeção visual no aumento de 40 x em quatro cortes histológicos do hipocampo utilizando microscópio óptico. Imagens representativas da imunomarcagem para (A) GFAP ou (B) CD68 na subregião CA1 (aumento: 100 x). Representação gráfica demonstrando uma redução do número de células positivas para (C) GFAP e (D) CD68 em cada um dos cortes histológicos do hipocampo de camundongos MIP-1α^{-/-} e CCR5^{-/-}, em comparação aos animais C57Bl/6 (+/+). Os

valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/(+/+); ##P < 0,01 comparado ao grupo A β_{1-40} /(+/+).

Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 no aumento da expressão da iNOS e da COX-2 induzido pelo peptídeo A β_{1-40}

A expressão das enzimas iNOS e COX-2 foi avaliada no hipocampo de camundongos C57Bl6 (+/+) 1 e 8 dias após o tratamento com os peptídeos amilóides, através da técnica de *western blot*. Os resultados da Figura 4 indicam que, em condições basais, a expressão de iNOS e COX-2 no hipocampo é detectada. Todavia, a injeção i.c.v. de A β_{1-40} (400 pmol/camundongo) induziu aumento significativo na expressão de ambas as enzimas, sendo a expressão máxima verificada 1 dia após o tratamento, efeito este que persiste por até 8 dias (Fig. 4A e B). Ao contrário, o tratamento com o peptídeo inverso A β_{40-1} não alterou o padrão de expressão da iNOS ou da COX-2.

A análise por *western blot* revelou também que o aumento na expressão da iNOS, observado no hipocampo 1 dia após a administração i.c.v. de A β_{1-40} , foi atenuado de maneira marcante nos animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$ ou CCR5 $^{-/-}$, em comparação com animais da linhagem C57Bl/6 (+/+) tratados com A β_{1-40} (Fig. 5A e B; inibição de 50% e 68%, respectivamente). Além disso, os dados ilustrados na Figura 5 (C e D) indicam que, em comparação com animais da linhagem C57Bl/6 (+/+), a deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5 promoveu redução significativa da expressão da COX-2 observada 1 dia após o tratamento com A β_{1-40} , conforme análise através da técnica de imunoistoquímica. As taxas de inibição observadas foram de 50% e 70%, respectivamente. Estes dados sugerem que a MIP-1 α e o CCR5 constituem importantes mediadores para o estabelecimento da resposta inflamatória induzida pelo peptídeo A β_{1-40} .

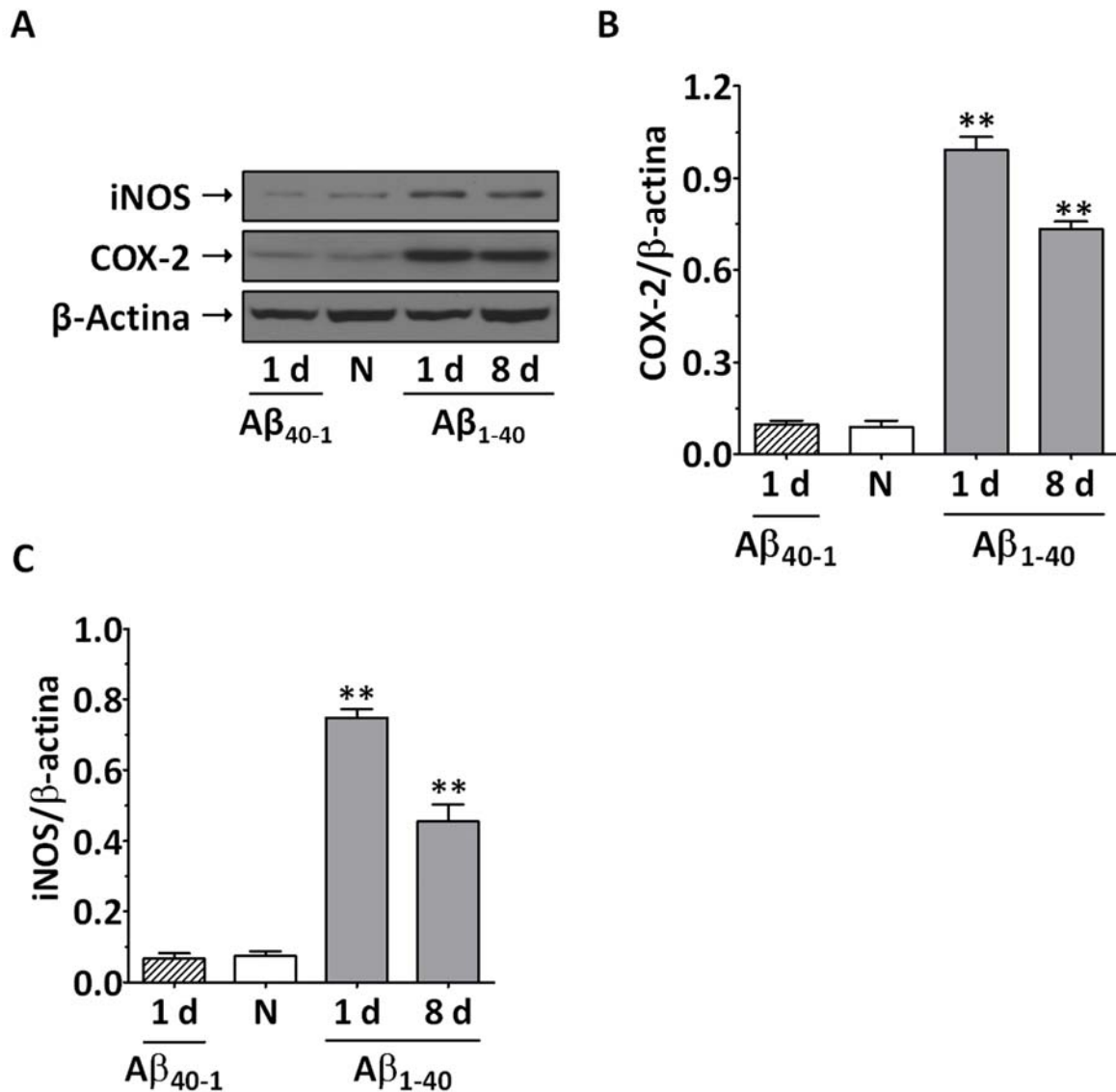


Figura 4 – Efeito do tratamento i.c.v. com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ sobre a expressão de iNOS e COX-2 no hipocampo de camundongos. A análise por *western blot* para iNOS e COX-2 foi realizada no hipocampo de camundongos C57Bl/6 (+/+) 1 e 8 dias após a injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{40-1}$ (400 pmol/camundongo). Animais *naïve* (N) foram utilizados como controle. (A) Imagens representativas demonstrando um aumento dependente do tempo da expressão de iNOS e COX-2 induzido pelo tratamento com $A\beta_{1-40}$. (B) Representação gráfica da densitometria óptica dos produtos de *western blot* para iNOS e COX-2 normalizada pelos produtos para β -actina. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 3/grupo). ** $P < 0,01$ comparado ao grupo *naïve*.

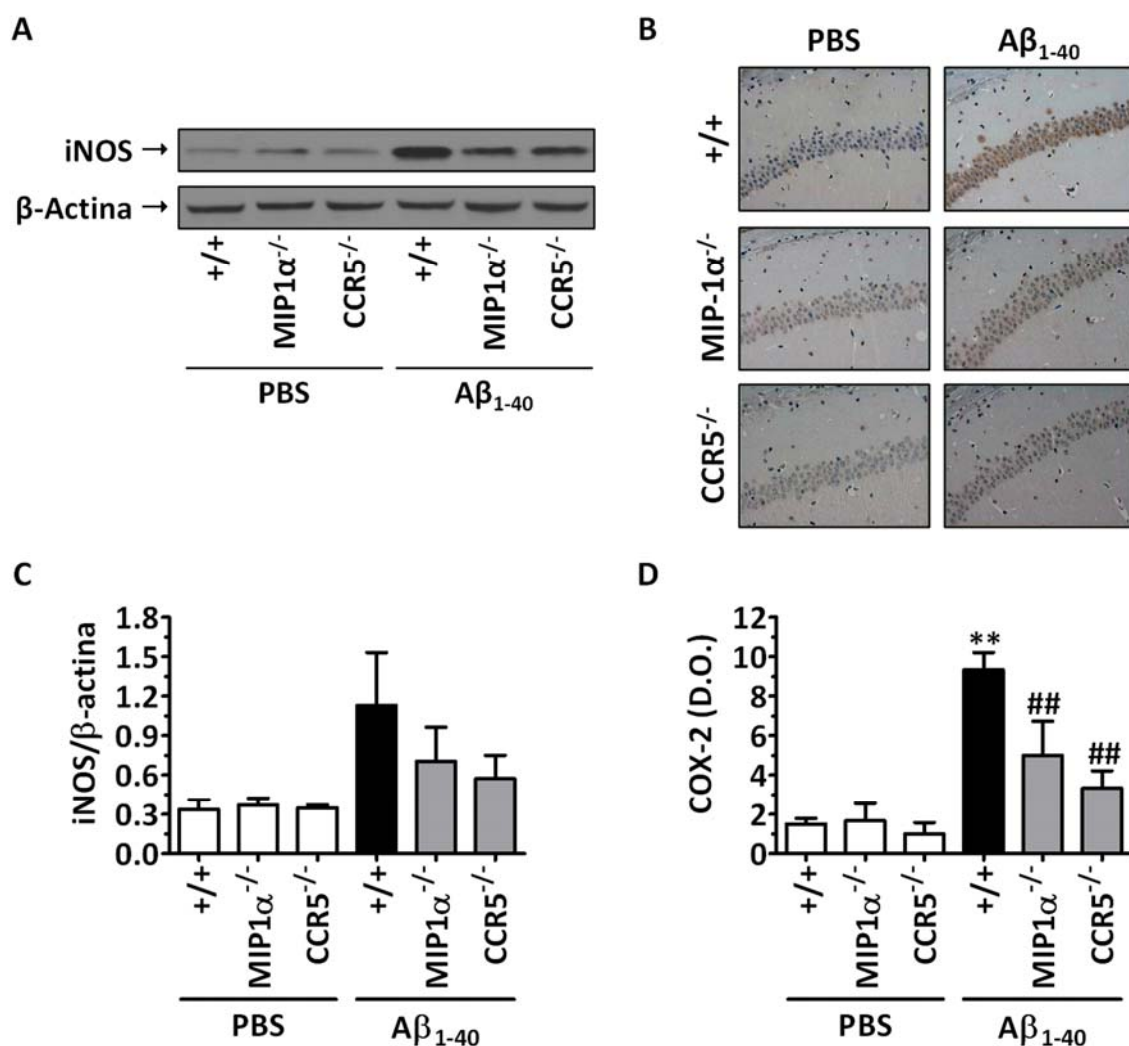


Figura 5 – Papel da MIP-1α e do CCR5 na expressão de iNOS e COX-2 induzida no hipocampo de camundongos pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀. As análises de *western blot* para iNOS ou de imunistoquímica para COX-2 foram realizadas 1 dia após o tratamento i.c.v. com Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS). Imagens representativas demonstrando redução na expressão da (A) iNOS e (B) COX-2 (subregião hipocampal CA1) induzida pelo Aβ₁₋₄₀ em animais MIP-1α^{-/-} e CCR5^{-/-}. Aumento: 20 x. Representação gráfica da densitometria óptica dos produtos de *western blot* para (C) iNOS obtidos no hipocampo normalizada pelos produtos para β-actina, ou da imunomarcacão média para (D) COX-2 avaliada nas subregiões hipocampais CA1, CA2, CA3 e giro denteado. Os valores representam a média ± E.P.M. (N = 3–5/grupo). **P < 0.01 comparado ao grupo PBS/(+/+); ##P < 0,01 comparado ao grupo Aβ₁₋₄₀/(+/+). D.O., densidade óptica.

Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de fatores de transcrição induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

A expressão das enzimas iNOS e COX-2 é regulada finamente em nível transcricional (Eberhardt et al., 1996; Kim e Fischer, 1998). Além disso, o envolvimento do receptor CCR5 na ativação de fatores de transcrição vem sendo descrito no hipocampo durante processos neuroinflamatórios (Rosi et al., 2005). Neste sentido, foi avaliada a participação da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de alguns fatores de transcrição com sítios de ligação presentes na região promotora dos genes que codificam a iNOS ou a COX-2, induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀. Em condições basais, é possível verificar níveis baixos de ativação de CREB, NF- κ B e AP-1 no hipocampo de camundongos da linhagem C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} e CCR5^{-/-} (Fig. 6). Os dados da Figura 6 demonstram também que a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) em camundongos C57Bl/6 (+/+) induziu o aumento da ativação dos fatores de transcrição CREB, NF- κ B e AP-1 quando avaliado 6 h após o tratamento, conforme análise de imunistoquímica para a forma fosforilada do CREB (p-CREB) e do número de células positivas para a forma fosforilada da p65 (p-p65) e da c-Jun (p-c-Jun) no hipocampo, respectivamente.

De maneira interessante, a deleção gênica da MIP-1 α e, em maior extensão, do CCR5 foi capaz de inibir significativamente o aumento dos níveis de p-CREB observados no hipocampo 6 h após o tratamento com A β ₁₋₄₀, em comparação com animais C57Bl/6 (+/+) (Fig. 6A e B; inibição de 45% e 94%, respectivamente).

Da mesma forma, foi possível observar redução do número de células positivas para p-p65 (Fig. 6C e D) ou p-c-Jun (Fig. 6E e F) no hipocampo dos

animais MIP-1 α ^{-/-} e CCR5^{-/-} tratados com A β ₁₋₄₀. As taxas de inibição observadas foram de 50% e 80% (p-p65) e de 43% e 80% (p-c-Jun), respectivamente.

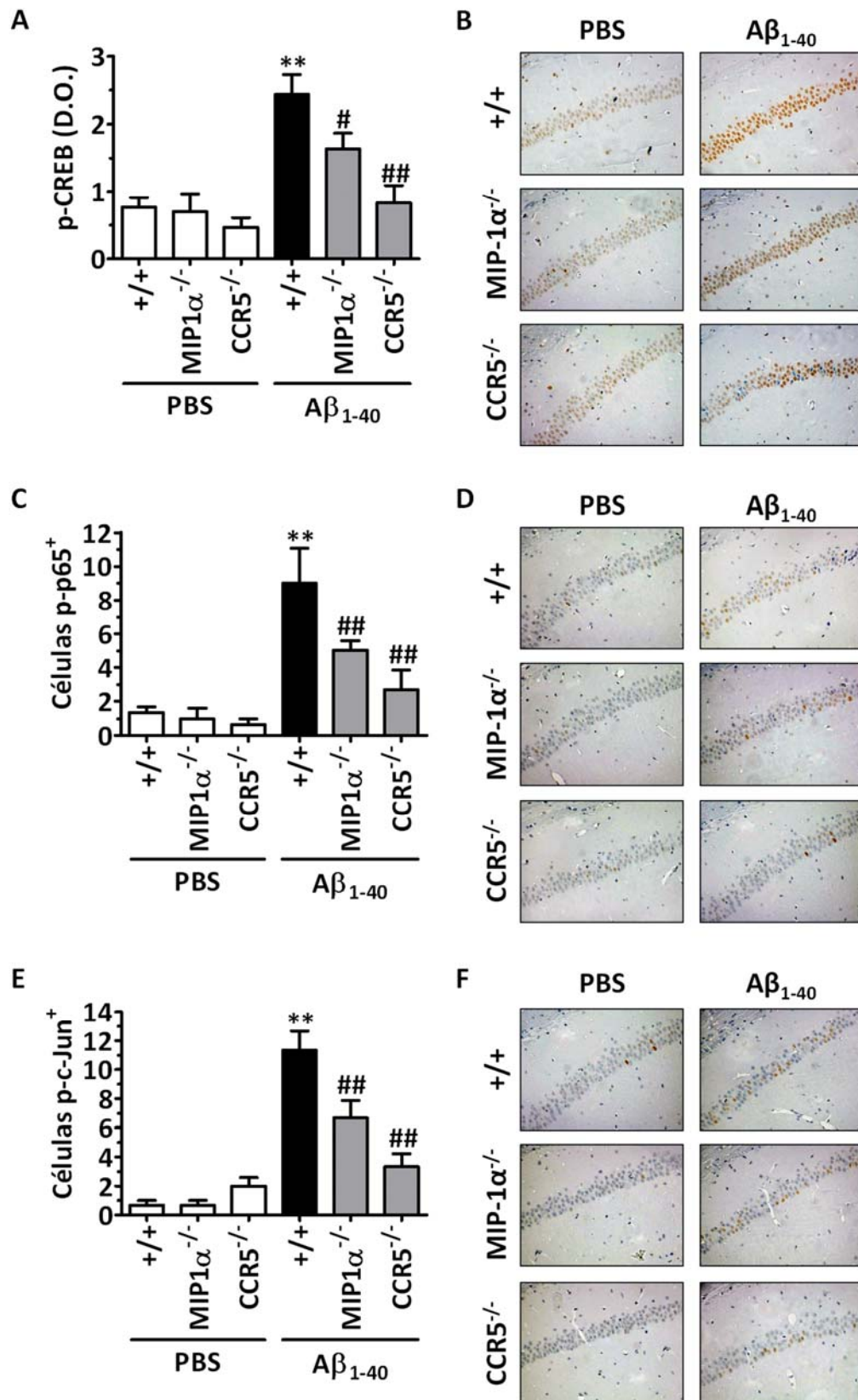


Figura 6 – Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 na ativação de fatores de transcrição induzida no hipocampo de camundongos após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀. A análise por imunistoquímica para p-CREB, p-p65 e p-c-Jun foi realizada 6 h após a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou PBS. (A) Representação gráfica da imunomarcação média para p-CREB avaliada nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado, demonstrando ativação reduzida em animais MIP-1 α ^{-/-} e CCR5^{-/-}, em comparação aos animais C57Bl/6 (+/+). Resultados similares foram observados quando o número de células positivas por corte histológico para (C) p-p65 ou (E) p-c-Jun foi determinado. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0.01 comparado ao grupo PBS/(+/+); #P < 0,05 e ##P < 0,01 comparado ao grupo A β ₁₋₄₀/(+/+). Imagens representativas da imunomarcação para (B) p-CREB, (D) p-p65 ou (F) p-c-Jun na subregião hipocâmpal CA1 de animais C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} e CCR5^{-/-}. Aumento: 20 x. D.O., densidade óptica.

Implicação da MIP-1 α e do CCR5 na migração e ativação celular in vitro

Com o objetivo de confirmar o envolvimento da quimiocina MIP-1 α e do receptor CCR5 na regulação da migração celular induzida pelo A β ₁₋₄₀, foram realizados estudos de quimiotaxia *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-}. Os resultados da Figura 7A demonstram que não ocorreu alteração na resposta migratória de macrófagos isolados de animais C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-} em resposta ao meio de cultura de células estimuladas com A β ₄₀₋₁ (30 μ M), quando comparada a resposta de células que não receberam estímulo quimiotático (controle). Por outro lado, o meio de cultura de células C57Bl/6 (+/+) estimuladas com A β ₁₋₄₀ (meio condicionado A β) promoveu aumento de cerca de 9 vezes no índice quimiotático de células obtidas de animais C57Bl/6 (+/+), em comparação ao grupo controle. Além disso, foi possível observar redução significativa do processo de migração de células CCR5^{-/-}, mas não de células MIP-1 α ^{-/-}, induzido

pelo meio condicionado A β obtido a partir de células C57Bl/6 (+/+), quando comparado a células C57Bl/6 (+/+) (Fig. 7A; inibição de 50%). Resultados semelhantes foram obtidos quando o meio condicionado A β produzido por células CCR5^{-/-} foi utilizado como estímulo quimiotático. Contudo, o meio condicionado A β obtido a partir de células MIP-1 α ^{-/-} se mostrou menos efetivo em induzir a quimiotaxia de células C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} e CCR5^{-/-}, em comparação com o meio condicionado A β produzido por células C57Bl/6 (+/+) (Fig. 7A; inibição de 60%, 70% e 83%, respectivamente).

Além do meio condicionado A β , a anafilotoxina C5a (10 nM) também promoveu aumento de cerca de 11 vezes no índice quimiotático de células obtidas de animais C57Bl/6 (+/+), em comparação ao controle (sem estímulo quimiotático) (Fig. 7B). De maneira importante, a deleção gênica da MIP-1 α ou do CCR5 não alterou o aumento no processo de migração celular induzido pela anafilotoxina C5a (Fig. 7B).

Com o objetivo de verificar o possível envolvimento direto da MIP-1 α ou do CCR5 na ativação celular, foi avaliada a produção de duas citocinas envolvidas na resposta inflamatória, a IL-1 β e o TNF- α . Para isso, macrófagos obtidos de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-} foram estimulados com LPS (100 ng/ml), anafilotoxina C5a (10 nM), A β ₁₋₄₀ (30 μ M) ou A β ₄₀₋₁ (30 μ M) durante 24 h e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de ELISA. O tratamento das células C57Bl/6 (+/+) com LPS, C5a ou A β ₁₋₄₀, mas não com A β ₄₀₋₁, resultou em aumento nos níveis de IL-1 β (Fig. 8A) e TNF- α (Fig. 8B) no sobrenadante das mesmas, em comparação ao grupo controle. Os resultados da Figura 8 (A e B) indicam ainda que as células MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-} respondem de maneira similar às células C57Bl/6 (+/+) aos estímulos utilizados. Por fim, como mostrado na Figura 8C,

nenhum dos tratamentos reduziu significativamente a viabilidade das células. Os resultados obtidos sugerem que a MIP-1 α e o CCR5 regulam diretamente o processo de migração celular, mas não a produção de proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

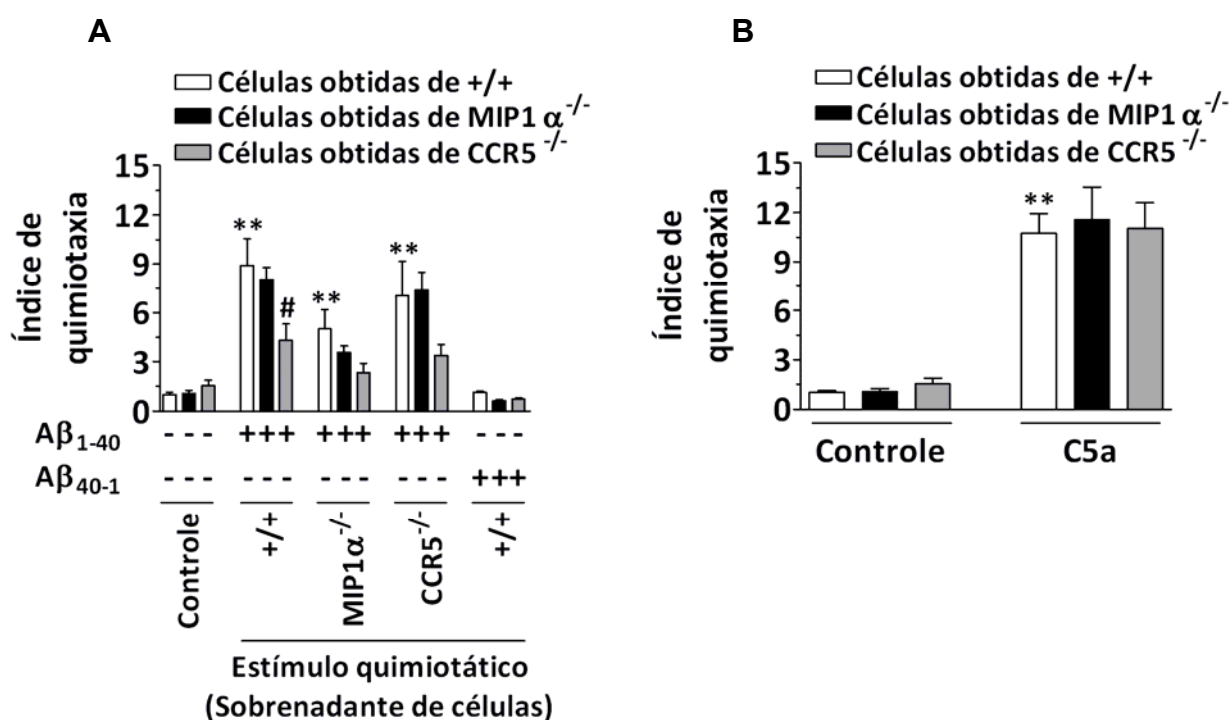


Figura 7 – Envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 na migração celular *in vitro*.

Macrófagos peritoneais foram isolados de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 $\alpha^{-/-}$ ou CCR5 $^{-/-}$, cultivados por 24 h na presença de 30 μ M A β_{40-1} ou A β_{1-40} (meio condicionado A β) e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de quimiotaxia. Índice de quimiotaxia de macrófagos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 $\alpha^{-/-}$ ou CCR5 $^{-/-}$, induzida pelo meio condicionado A β ou pelo meio de cultura de macrófagos estimulados com A β_{40-1} (A), ou pela C5a (10 nM) (B). O índice de quimiotaxia foi determinado através do cálculo da razão entre o número de macrófagos que migraram em resposta ao estímulo quimiotático e o número de macrófagos que migraram em resposta ao meio RPMI 1640 (migração basal). Os experimentos foram realizados em triplicata. O termo “controle” se refere a células não estimuladas. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 3/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo controle. #P < 0,05 comparado ao grupo A β_{1-40} (+/+).

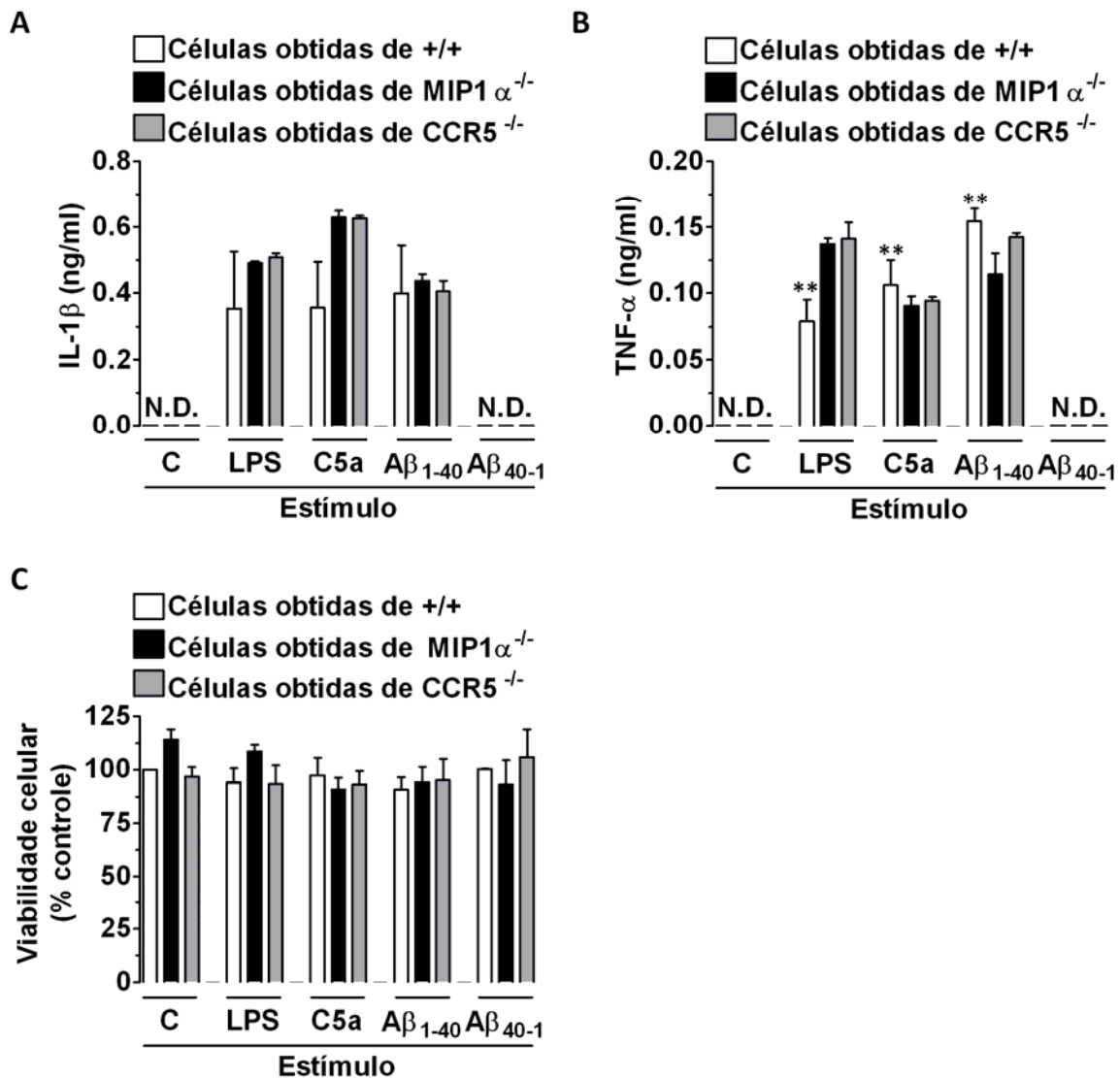


Figura 8 – Papel da MIP-1 α e do CCR5 na ativação celular *in vitro*. Determinação dos níveis das citocinas (A) IL-1 β e (B) TNF- α no sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 $\alpha^{-/-}$ ou CCR5 $^{-/-}$, estimulados com LPS (100 ng/ml), anafilotoxina C5a (10 nM), A β ₁₋₄₀ (30 μ M) ou A β ₄₀₋₁ (30 μ M) por 24 h. O sobrenadante de macrófagos estimulados com veículo foi utilizado como controle. (C) Viabilidade celular determinada após a estimulação celular com LPS, anafilotoxina C5a, A β ₁₋₄₀ ou A β ₄₀₋₁. A medida dos níveis de citocinas foi realizada em duplicata. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 3/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo controle. N.D., não detectável.

Papel da MIP-1 α e do CCR5 no dano cognitivo induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

A doença de Alzheimer é caracterizada clinicamente pelo declínio progressivo e irreversível das funções de aprendizado e memória (Mattson, 2004). No presente estudo foi avaliada a capacidade de aquisição (sessão de treino, 7 dias após a injeção i.c.v. de A β , com plataforma) e retenção (sessão de teste, 1 dia após o treino, sem plataforma) dos animais frente a informação espacial obtida no labirinto aquático de Morris, como indicativas das funções de aprendizado e memória. Os dados da Figura 9 mostram que a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) em camundongos C57Bl/6 (+/+) resultou em declínio na função cognitiva, como demonstrado pelo aumento das latências para encontrar a plataforma na sessão de treino (Fig. 9A e C) e pela redução na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste (Fig. 9B e D), em relação aos animais controle (PBS/+/+).

Para verificar o envolvimento da MIP-1 α e do CCR5 no dano cognitivo induzido pelo A β ₁₋₄₀, animais com ausência do gene para a MIP-1 α ou para o CCR5 foram tratados com o peptídeo e submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. Os animais MIP-1 α ^{-/-} apresentaram redução do dano sobre a memória espacial induzido pelo A β ₁₋₄₀, como verificado pelas menores latências para encontrar a plataforma durante a sessão de treino, em comparação aos animais da linhagem C57Bl/6 (+/+) tratados com A β ₁₋₄₀ (Fig. 9A). Quando os animais foram submetidos à sessão de teste, foi possível observar aumento significativo da preferência pelo quadrante correto nos animais MIP-1 α ^{-/-} (Fig. 9B e C) tratados com A β ₁₋₄₀, em comparação aos animais C57Bl/6 (+/+) tratados com o peptídeo, indicando maior resistência destes animais ao prejuízo cognitivo induzido pelo A β ₁₋₄₀. De maneira semelhante, os resultados ilustrados na Figura 10 mostram

que o CCR5 parece exercer papel importante no declínio de memória induzido pela $A\beta_{1-40}$, uma vez que a deleção gênica do CCR5 resultou em redução das latências para encontrar a plataforma na sessão de treino, em comparação aos animais da linhagem C57Bl/6 (+/+) tratados com o peptídeo (Fig. 10A). Além disso, a análise dos dados obtidos na sessão de teste indica que os animais CCR5^{-/-} apresentaram inibição significativa do dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$, como demonstrado pelo aumento na preferência pelo quadrante correto em relação aos animais C57Bl/6 (+/+) tratados com $A\beta_{1-40}$ (Fig. 10B e C). Os efeitos da $A\beta_{1-40}$ no desempenho dos camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-} no labirinto aquático de Morris não parecem estar associados a alterações da atividade locomotora dos animais, uma vez que este tratamento não interferiu na velocidade de nado (Fig. 9D e Fig. 10D) e distância percorrida (Fig. 9E e Fig. 10E) durante a sessão de teste, bem como nos parâmetros comportamentais de exploração (cruzamentos e atos de levantar) no teste do campo aberto (Tabela 1).

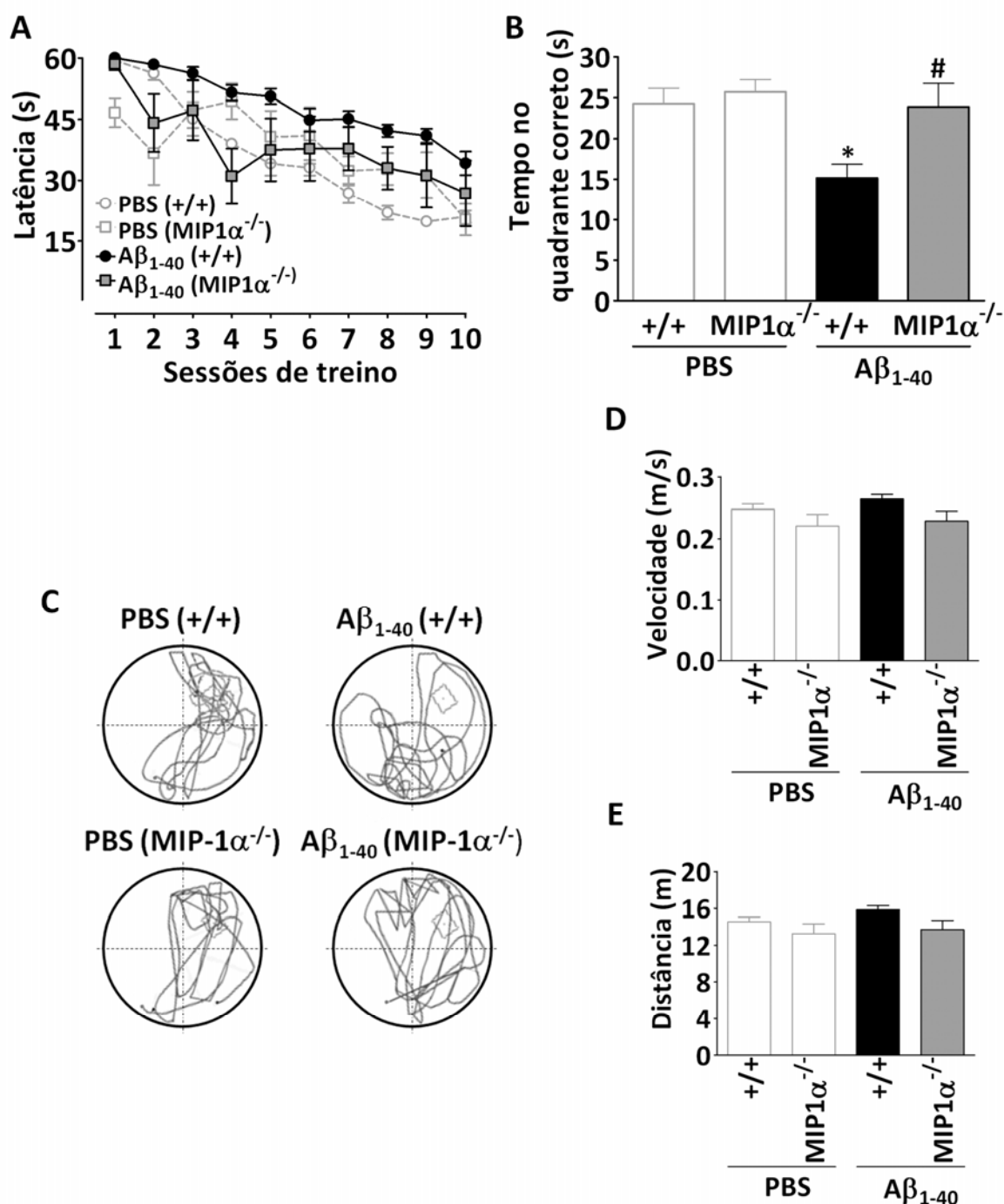


Figura 9 – Envolvimento da MIP-1α no dano cognitivo induzido pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ₁₋₄₀ em camundongos. Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático de Morris, respectivamente, 7 e 8 dias após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS). (A) Tempo (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris durante a sessão de treino. (B) Tempo gasto no quadrante correto, (C) trajetória de nado, (D) velocidade e (E) distância percorrida dos

animais no labirinto aquático de Morris durante a sessão de teste. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo). *P < 0,05 comparado ao grupo PBS/(+/+). #P < 0,05 comparado ao grupo A β_{1-40} /(+/+).

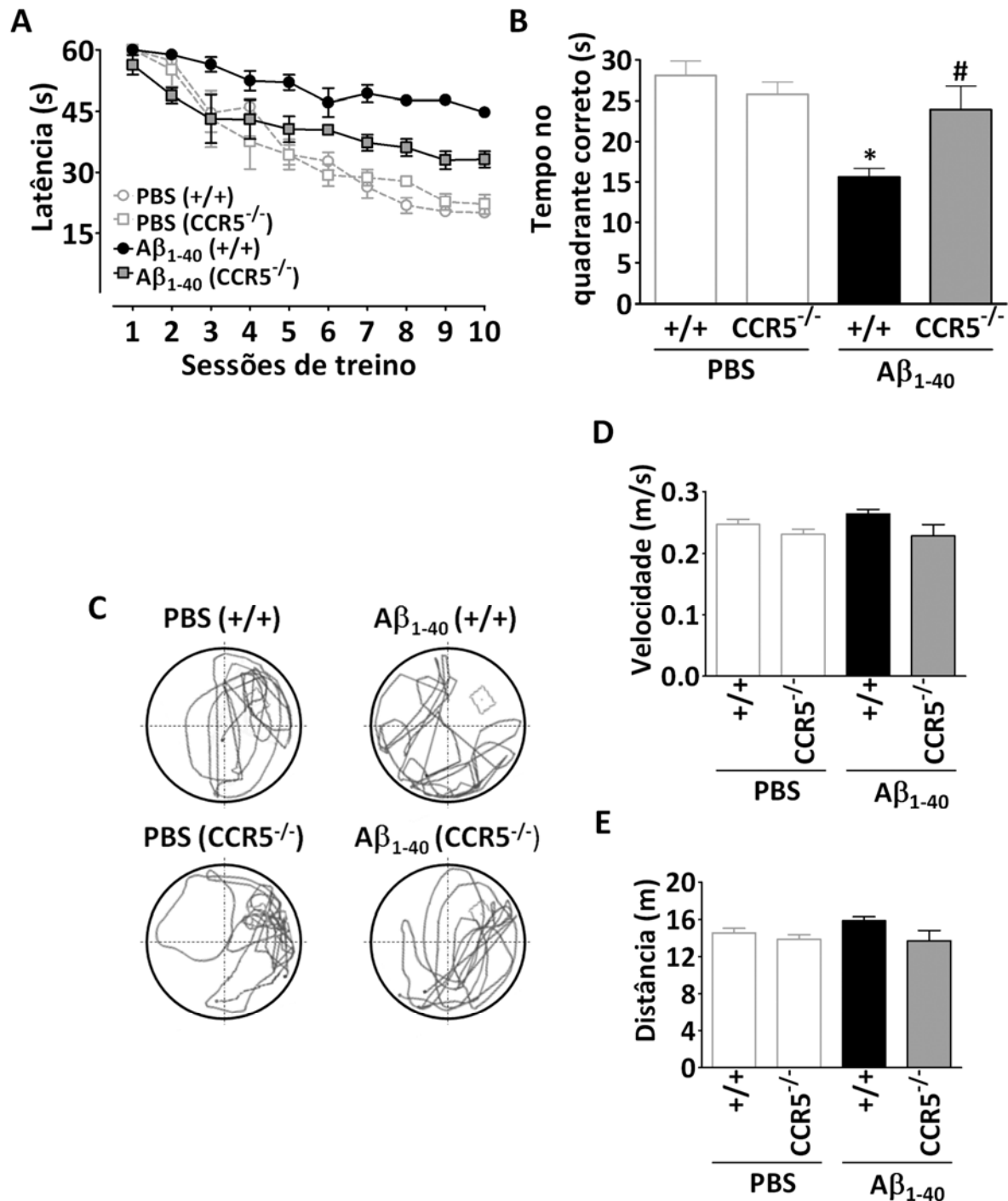


Figura 10 – Envolvimento do CCR5 no dano cognitivo induzido pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo A β_{1-40} em camundongos. Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático de Morris, respectivamente, 7 e 8 dias

após a injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS). (A) Tempo (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris durante a sessão de treino. (B) Tempo gasto no quadrante correto, (C) trajetória de nado, (D) velocidade e (E) distância percorrida dos animais no labirinto aquático de Morris durante a sessão de teste. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo). *P < 0,05 comparado ao grupo PBS/(+/+). #P < 0,05 comparado ao grupo A β ₁₋₄₀/(+/+).

Tratamento	Linhagem	Cruzamentos	Atos de levantar
PBS	C57Bl/6 (+/+)	101 \pm 4	34 \pm 2
	MIP-1 α ^{-/-}	125 \pm 6*	30 \pm 2
	CCR5 ^{-/-}	96 \pm 4	37 \pm 2
Aβ₁₋₄₀	C57Bl/6 (+/+)	102 \pm 6	32 \pm 2
	MIP-1 α ^{-/-}	135 \pm 7 [#]	35 \pm 3
	CCR5 ^{-/-}	93 \pm 4	36 \pm 2

Tabela 1 – Efeito da administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ sobre os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto de camundongos C57Bl/6 (+/+), MIP-1 α ^{-/-} ou CCR5^{-/-}. Os diferentes grupos foram avaliados no campo aberto 8 dias após a injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS). Foi avaliado o número de cruzamentos e atos de levantar durante um período de 5 min. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo). *P < 0.05 comparado ao grupo PBS/(+/+). #P < 0,05 comparado ao grupo A β ₁₋₄₀/(+/+).

Papel da MIP-1 α e do CCR5 na disfunção sináptica induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

Com o objetivo de avaliar a integridade sináptica 8 dias após a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo), foi avaliada a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina no hipocampo pela técnica de imunistoquímica. Os dados da Figura 11 mostram que o tratamento i.c.v. com o

$A\beta_{1-40}$ resultou em redução significativa dos níveis hipocampais de sinaptofisina, em comparação com os animais da linhagem C57Bl/6 (+/+) tratados com PBS, sugerindo um processo de disfunção sináptica induzido pelo peptídeo. No entanto, tanto os animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$ quanto os animais CCR5 $^{-/-}$ parecem ser mais resistentes ao processo de disfunção sináptica induzido pelo $A\beta_{1-40}$, como demonstrado pelos níveis significativamente elevados de sinaptofisina em comparação com os animais C57Bl/6 (+/+) tratados com $A\beta_{1-40}$ (Fig. 11A e B; inibição de 50 e 100%, respectivamente).

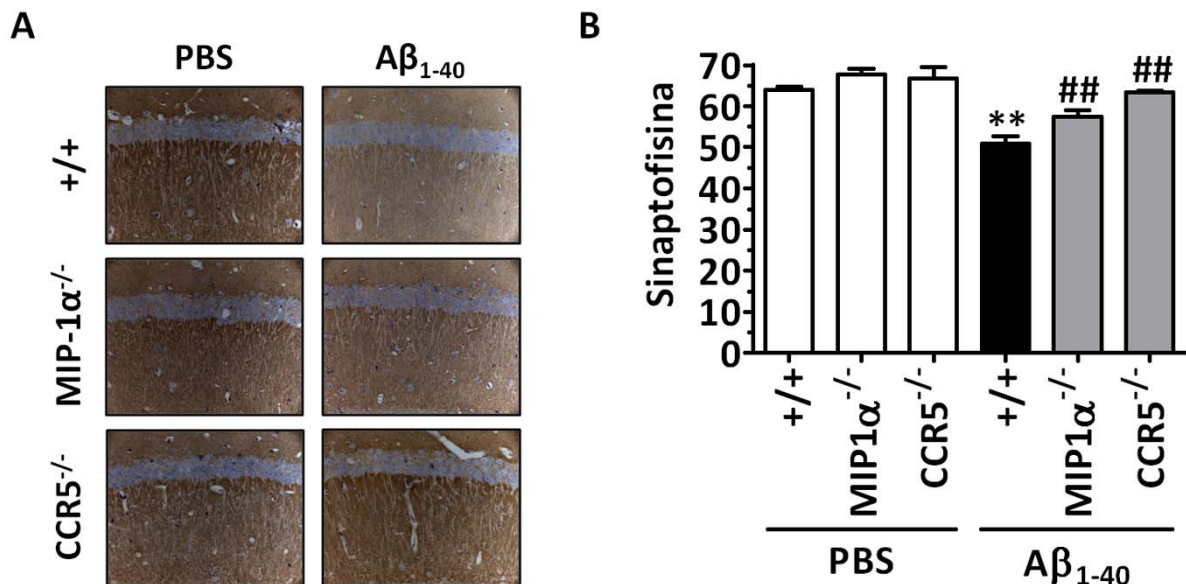


Figura 11 – Papel da MIP-1 α e do CCR5 no dano sináptico induzido pela administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ em camundongos. (A) Imagens representativas da reação de imunistoquímica para a proteína pré-sináptica sinaptofisina em tecidos coletados 8 dias após a administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo) ou PBS. Aumento de 40 x. (B) Medida da densidade óptica da imunoreatividade da sinaptofisina avaliada nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/(+/+). ##P < 0,01 comparado ao grupo $A\beta_{1-40}$ /(+/+).

Papel da via PI3K γ na ativação de células gliais induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

Para verificar o possível envolvimento da via PI3K γ no acúmulo de células gliais ativadas induzido pela A β ₁₋₄₀, foi avaliada a imunomarcação para GFAP e CD68 no hipocampo de camundongos C57Bl/6 (+/+) tratados com um inibidor seletivo da PI3K γ , o composto AS605240. Conforme descrito anteriormente, cérebros obtidos de animais tratados por via i.c.v. com PBS apresentaram células positivas para GFAP ou CD68 no hipocampo (Fig. 12). Por outro lado, a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) resultou em aumento significativo do número de células positivas para GFAP e CD68 no hipocampo, quando avaliado 6 h e 8 dias após o tratamento, respectivamente (Fig. 12). Os resultados da Figura 12 mostram ainda que o bloqueio farmacológico da PI3K γ com o uso do AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) inibiu significativamente o aumento do número de astrócitos (Fig. 12A e C; inibição de 63%) e de células microgliais (Fig. 12B e D; inibição de 88%) ativados induzido pela A β ₁₋₄₀, quando comparado ao grupo que recebeu A β ₁₋₄₀/veículo, como demonstrado pela redução no número de células positivas para GFAP e CD68, respectivamente. Estes dados demonstram que a via da PI3K γ exerce papel fundamental no processo de migração celular induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.

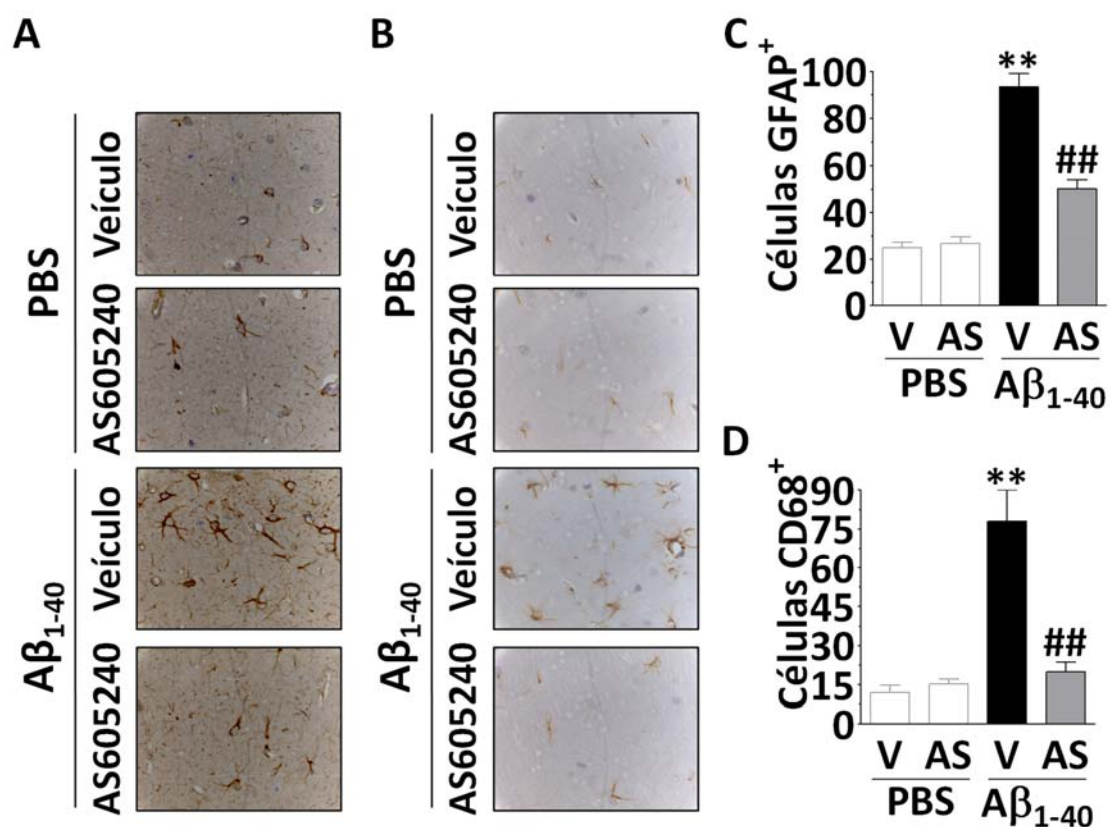


Figura 12 – Efeito do AS605240 sobre a ativação de células gliais induzida no hipocampo de camundongos pelo tratamento i.c.v. com Aβ₁₋₄₀. O AS605240 (AS; 30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) e duas vezes ao dia (12/12 h) durante os dias consecutivos até o momento da coleta dos tecidos para análise de imunoistoquímica. Animais tratados com veículo (V; PBS, v.o.) foram utilizados como controle. A contagem de células positivas foi realizada por meio de inspeção visual no aumento de 40 x em quatro cortes histológicos do hipocampo utilizando microscópio óptico. Imagens representativas da imunomarcação para (A) GFAP ou (B) CD68 avaliada em tecidos coletados, respectivamente, 6 h e 8 dias após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ ou PBS. Aumento de 100 x (subregião hipocampal CA1). Representação gráfica do número de células positivas para (C) GFAP ou (D) CD68 em cada um dos cortes histológicos do hipocampo. Os valores representam a média ± E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/veículo. ##P < 0,01 comparado ao grupo Aβ₁₋₄₀/veículo.

Envolvimento da via PI3Ky no aumento da expressão da COX-2 induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

A expressão da COX-2 foi avaliada no hipocampo de camundongos C57Bl/6 (+/+) 24 h após o tratamento com A β ₁₋₄₀, através da técnica de imunistoquímica. Os dados da Figura 13 indicam que, conforme demonstrado anteriormente, a enzima COX-2 foi detectada no hipocampo de animais tratados por via i.c.v. com PBS. Por sua vez, o tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀ promoveu aumento significativo na expressão da enzima nas diferentes subregiões do hipocampo. O tratamento com AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) inibiu de maneira significativa o aumento da expressão da COX-2 induzido pelo A β ₁₋₄₀, quando comparado com animais que receberam A β ₁₋₄₀/veículo, como indicado pela imunomarcacão reduzida para COX-2 (Fig. 13A e B). A inibição observada foi de 83%. Estes resultados indicam que a PI3Ky é um importante mediador na regulação da expressão da proteína COX-2 neste modelo experimental.

Papel da via PI3Ky na migração e ativação celular in vitro

Para confirmar a participação da via PI3Ky na regulação do processo de migração celular foram realizados estudos de quimiotaxia *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 (+/+). Como exposto na Figura 14A, o AS605240 (0,1-10 μ M) não alterou de forma significativa a migração espontânea dos macrófagos. Por outro lado, o meio de cultura de células estimuladas com A β ₁₋₄₀ (meio condicionado A β) e a anafilotoxina C5a (10 nM) promoveram aumento de 9 e 16 vezes no índice quimiotático, respectivamente. Além disso, o AS605240 reduziu de maneira dependente da concentração o aumento no processo de migração celular induzido pelos agentes quimiotáticos. A

concentração inibitória 50% (CI_{50}) do AS605240 frente aos estímulos quimiotáticos meio condicionado A β e anafilotoxina C5a foi de 4,7 (1,2–8,2) μ M e 3,4 (1,2–5,6) μ M, respectivamente.

Com o objetivo de avaliar o possível papel da via PI3K γ no controle da produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória, os macrófagos foram tratados com LPS (100 ng/ml), anafilotoxina C5a (10 nM) ou A β_{1-40} (30 μ M) na ausência ou presença do AS605240 (0,1–10 μ M) durante 24 h, e o sobrenadante destas células foi utilizado no ensaio de ELISA. O tratamento das células com os diferentes estímulos resultou em aumento nos níveis de IL-1 β (Fig. 14B) e TNF- α (Fig. 14C). Entretanto, o AS605240 não alterou o aumento na produção das citocinas IL-1 β e TNF- α induzido pelo LPS, anafilotoxina C5a ou pelo A β_{1-40} . De maneira importante, nenhum dos tratamentos reduziu de maneira significativa a viabilidade celular (Fig. 14D). Em conjunto, estes dados indicam que a PI3K γ modula a produção de proteínas envolvidas no processo inflamatório de maneira indireta, possivelmente via redução no processo de migração celular.

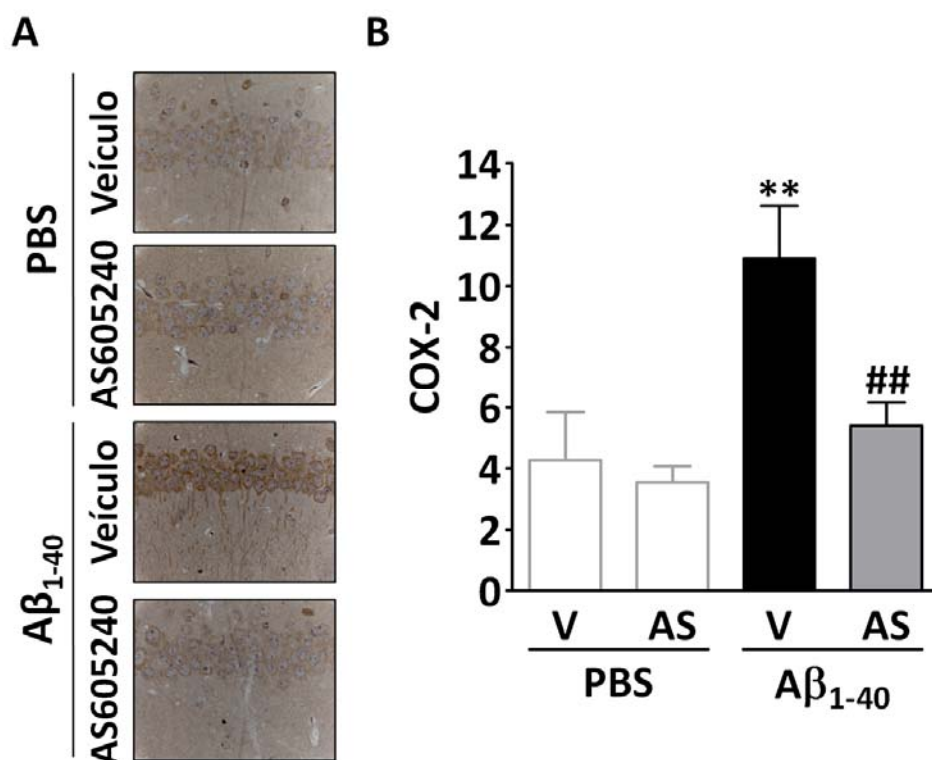


Figura 13 – Efeito do AS605240 sobre o aumento da expressão da COX-2 induzido no hipocampo de camundongos pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ₁₋₄₀. A análise de imunistoquímica para COX-2 foi realizada 24 h após a administração i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou PBS. O AS605240 (AS; 30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀. Animais tratados com veículo (V; PBS, v.o.) foram utilizados como controle. (A) Imagens representativas da imunomarcagem para COX-2. Aumento de 100 x (subregião hipocampal CA1). (B) Representação gráfica da imunomarcagem média para COX-2 avaliada nas subregiões hipocampus CA1, CA2, CA3 e giro denteado. Os valores representam a média ± E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/veículo. ##P < 0,01 comparado ao grupo Aβ₁₋₄₀/veículo.

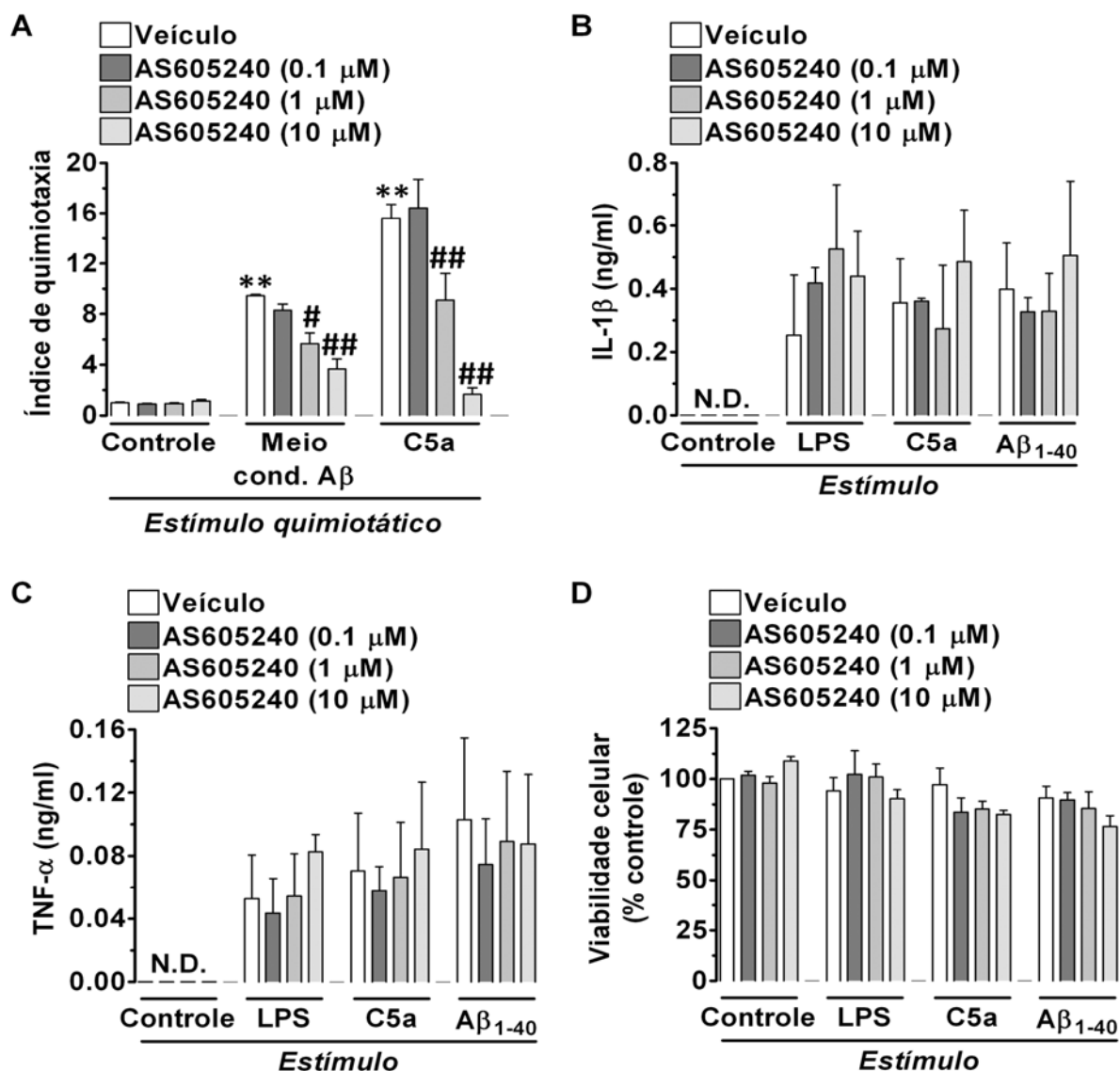


Figura 14 – Efeito do AS605240 sobre a migração e ativação celular *in vitro*.

(A) Índice de quimiotaxia de macrófagos peritoneais induzida pelo meio de cultura de macrófagos estimulados por 24 h com Aβ₁₋₄₀ (meio condicionado Aβ) ou pela anafilotoxina C5a (10 nM). O índice de quimiotaxia foi determinado através do cálculo da razão entre o número de macrófagos que migraram em resposta ao estímulo quimiotático e o número de macrófagos que migraram em resposta ao meio RPMI 1640 (migração basal). O AS605240 (0,1–10 μM) ou veículo (meio RPMI 1640) foi adicionado nos compartimentos superior e inferior da câmara de quimiotaxia. Determinação dos níveis das citocinas (B) IL-1β e (C) TNF-α no sobrenadante de células estimuladas com LPS (100 ng/ml), anafilotoxina C5a (10 nM) ou Aβ₁₋₄₀ (30 μM) por 24 h na ausência ou na presença do AS605240 (0.1–10 μM). (D) Viabilidade celular determinada após a estimulação com LPS,

anafilotoxina C5a ou A β_{1-40} . Os experimentos de quimiotaxia foram realizados em triplicata e a medida dos níveis de citocinas realizada em duplicata. O termo “controle” se refere a células não estimuladas. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 3/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo controle. #P < 0,05 e ##P < 0,01 comparado ao respectivo agente quimiotático/veículo.

Envolvimento da via PI3Ky no dano cognitivo induzido pelo A β_{1-40}

Como demonstrado anteriormente, a administração i.c.v. de A β_{1-40} (400 pmol/camundongo) em camundongos C57Bl/6 (+/+) resultou em declínio na função cognitiva, como demonstrado pelas altas latências para encontrar a plataforma na sessão de treino (Fig. 15A; 7 dias após a administração) e pela redução na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste (Fig. 15B; 8 dias após a administração), em relação aos animais controle (PBS, i.c.v.). Com o objetivo de avaliar a participação da via PI3Ky no processo de dano cognitivo induzido pela A β_{1-40} , os animais foram tratados com o AS605240 (30 mg/Kg, v.o.). Os dados ilustrados na figura 15 indicam que o AS605240 não promoveu alterações significativas per se no desempenho dos camundongos nas sessões de treino e teste do labirinto aquático de Morris, sugerindo que a via PI3Ky não participa do processo de aprendizado e memória espacial de camundongos. Por outro lado, o tratamento com AS605240 reduziu significativamente o prejuízo no processo de aprendizado e memória induzido pela injeção i.c.v. da A β_{1-40} . Os animais tratados com AS605240 apresentaram desempenho melhor no labirinto aquático de Morris em relação ao grupo tratado com A β_{1-40} /veículo, como indicado pela redução nas latências para encontrar a plataforma na sessão de treino (Fig. 15A) e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste (Fig 15B e C). De maneira importante, os efeitos da A β_{1-40} e do AS605240 sobre o desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris não parecem estar

associados a alterações da atividade locomotora dos animais, uma vez que estes tratamentos não interferiram na velocidade de nado (Fig. 15D) e distância percorrida (Fig. 15E) durante a sessão de teste, ou ainda nos parâmetros comportamentais de exploração (cruzamentos e atos de levantar) no teste do campo aberto (Tabela 2).

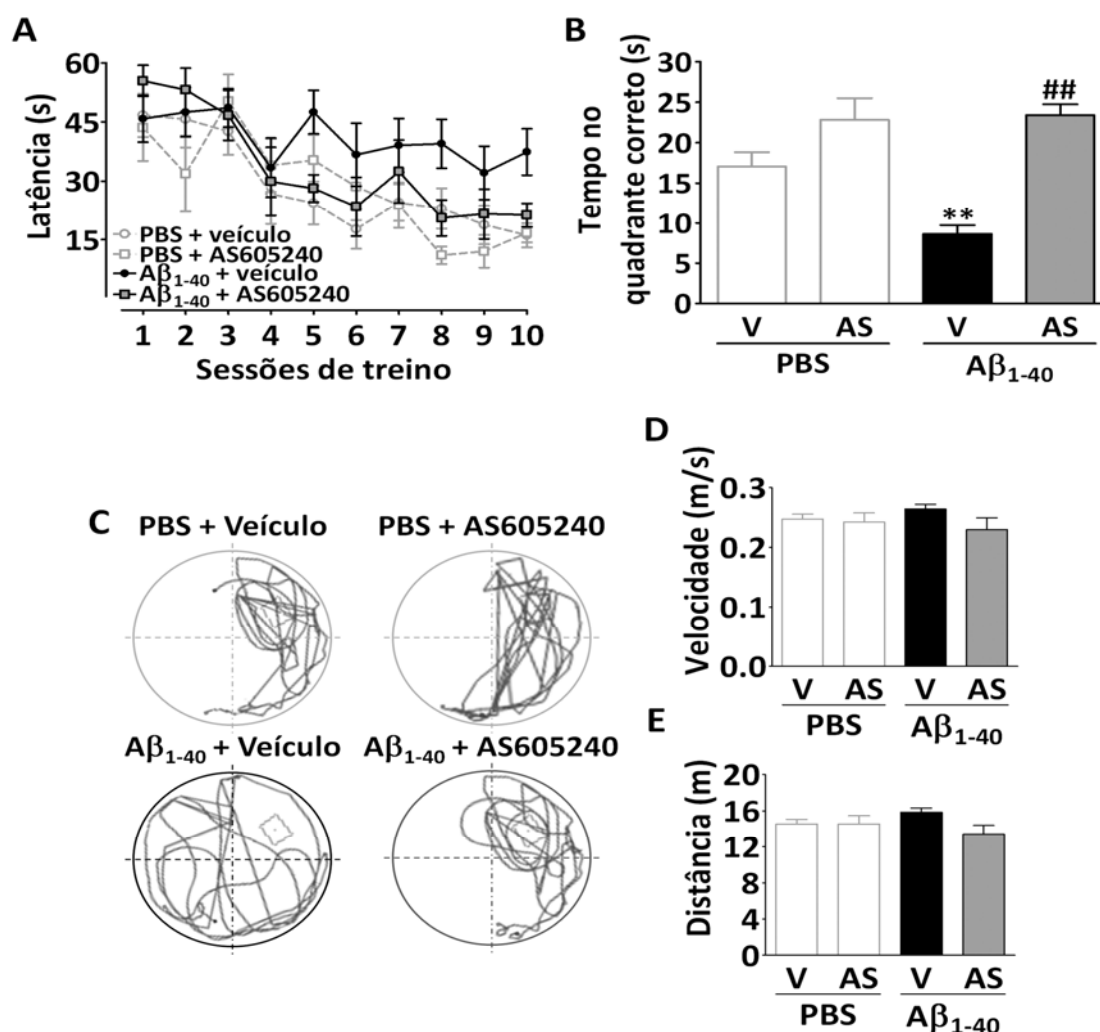


Figura 15 – Efeito do AS605240 sobre o dano cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ em camundongos. O AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) e duas vezes ao dia (12/12 h) durante os dias consecutivos

até o momento da realização dos experimentos. Animais tratados com veículo (V; PBS, v.o.) foram utilizados como controle. Os diferentes grupos foram treinados e testados no labirinto aquático de Morris, respectivamente, 7 e 8 dias após a injeção i.c.v. da A β ₁₋₄₀ ou PBS. (A) Tempo (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris durante a sessão de treino. (B) Tempo gasto no quadrante correto, (C) trajetória de nado, (D) velocidade e (E) distância percorrida dos animais no labirinto aquático de Morris durante a sessão de teste. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/veículo. ###P < 0,01 comparado ao grupo A β ₁₋₄₀/veículo.

Pré-tratamento	Tratamento	Cruzamentos	Atos de levantar
PBS	PBS	101 \pm 4	34 \pm 2
	A β ₁₋₄₀	102 \pm 6	32 \pm 2
AS605240	PBS	93 \pm 6	29 \pm 1
	A β ₁₋₄₀	114 \pm 6	29 \pm 1

Tabela 2 – Efeito do tratamento com A β ₁₋₄₀ e/ou AS605240 sobre os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto. O AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) e duas vezes ao dia (12/12 h) durante os dias consecutivos até o momento da realização dos experimentos. Animais tratados com PBS (v.o.) foram utilizados como controle. Os diferentes grupos foram avaliados no campo aberto 8 dias após a injeção i.c.v. da A β ₁₋₄₀ ou veículo (PBS). Foi avaliado o número de cruzamentos e atos de levantar durante um período de 5 min. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo).

Papel da via PI3K γ na disfunção sináptica induzida pelo A β ₁₋₄₀

Com o objetivo de avaliar a possível participação da via PI3K γ no dano sináptico induzido pela A β ₁₋₄₀, foi analisada a expressão hipocampal da proteína pré-sináptica sinaptofisina 8 dias após a administração do peptídeo em animais tratados com AS605240. Como demonstrado na Figura 16, o nível de detecção da sinaptofisina no hipocampo de animais tratados com A β ₁₋₄₀ foi menor em relação

aos animais tratados por via i.c.v. com PBS (redução de 25%). De maneira importante, o tratamento com AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) inibiu significativamente a redução dos níveis de sinaptofisina induzida pela administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$, como demonstrado pela maior detecção da proteína sinaptofisina no hipocampo (Fig. 16; inibição de 75%).

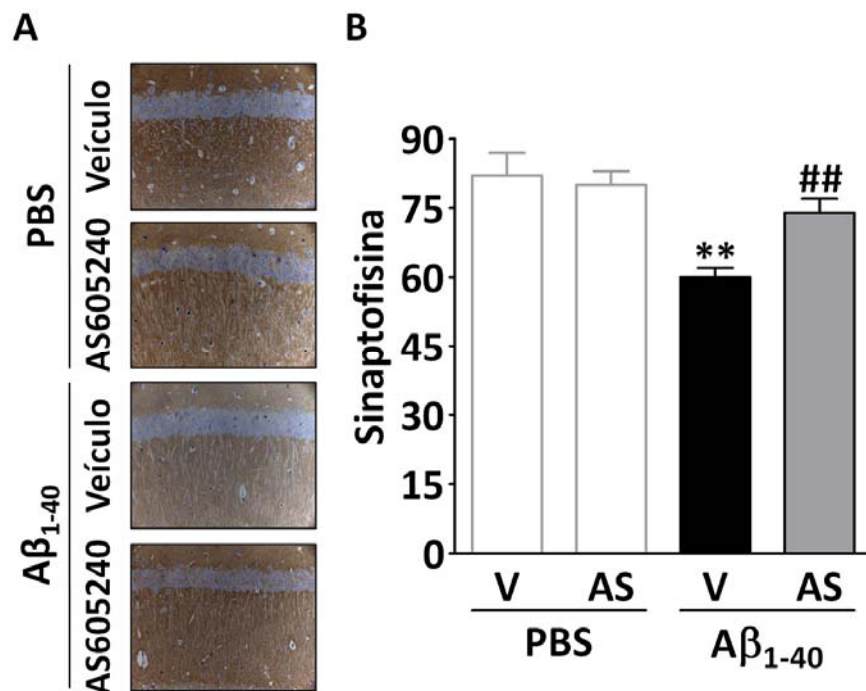


Figura 16 – Efeito do AS605240 sobre o dano sináptico induzido pela administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. O AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes e 12 h após a injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo) e duas vezes ao dia (12/12 h) durante os dias consecutivos até o momento da realização dos experimentos. Animais tratados com veículo (V; PBS, v.o.) foram utilizados como controle. (A) Imagens representativas da reação de imunoistoquímica para a proteína pré-sináptica sinaptofisina na em tecidos coletados 8 dias após a administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou PBS. Aumento de 40 x. (B) Medida da densidade óptica da imunoreatividade da sinaptofisina avaliada nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/veículo. ##P < 0,01 comparado ao grupo $A\beta_{1-40}$ /veículo.

Envolvimento da via PI3Ky no dano cognitivo induzido pela escopolamina

A neurotransmissão colinérgica tem papel importante no controle das funções cognitivas. O prejuízo no aprendizado e memória induzido pela administração de escopolamina foi previamente demonstrado em humanos, bem como em diferentes modelos experimentais em animais (Ebert e Kirch, 1998; Kim et al., 2007). Confirmando estes dados, o tratamento dos animais com escopolamina (1 mg/Kg, i.p.) resultou em aumento na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino (Fig. 17A) e redução do tempo no quadrante correto na sessão de teste (Fig. 17B), em relação aos animais controle (PBS, i.p.).

A fim de testar o efeito da via PI3Ky sobre a amnésia induzida pela escopolamina os animais foram tratados com AS605240 (30 mg/Kg, v.o.). Como demonstrado na Figura 17, o AS605240 não foi capaz de reduzir o dano cognitivo promovido pela administração de escopolamina. Os animais tratados com o inibidor da PI3Ky apresentaram desempenho similar aos animais tratados com veículo (PBS, v.o.) nas sessões de treino (Fig. 17A) e teste (Fig. 17B), após a injeção do antagonista muscarínico. Além disso, a análise da trajetória de nado demonstrou que os animais tratados com escopolamina nadaram de maneira aleatória no labirinto aquático de Morris, mesmo quando tratados com AS605240 (Fig. 17C). Por fim, os dados de velocidade de nado (Fig. 17D) e distância percorrida (Fig. 17E) indicam que os diferentes tratamentos não promoveram alterações na capacidade locomotora dos animais.

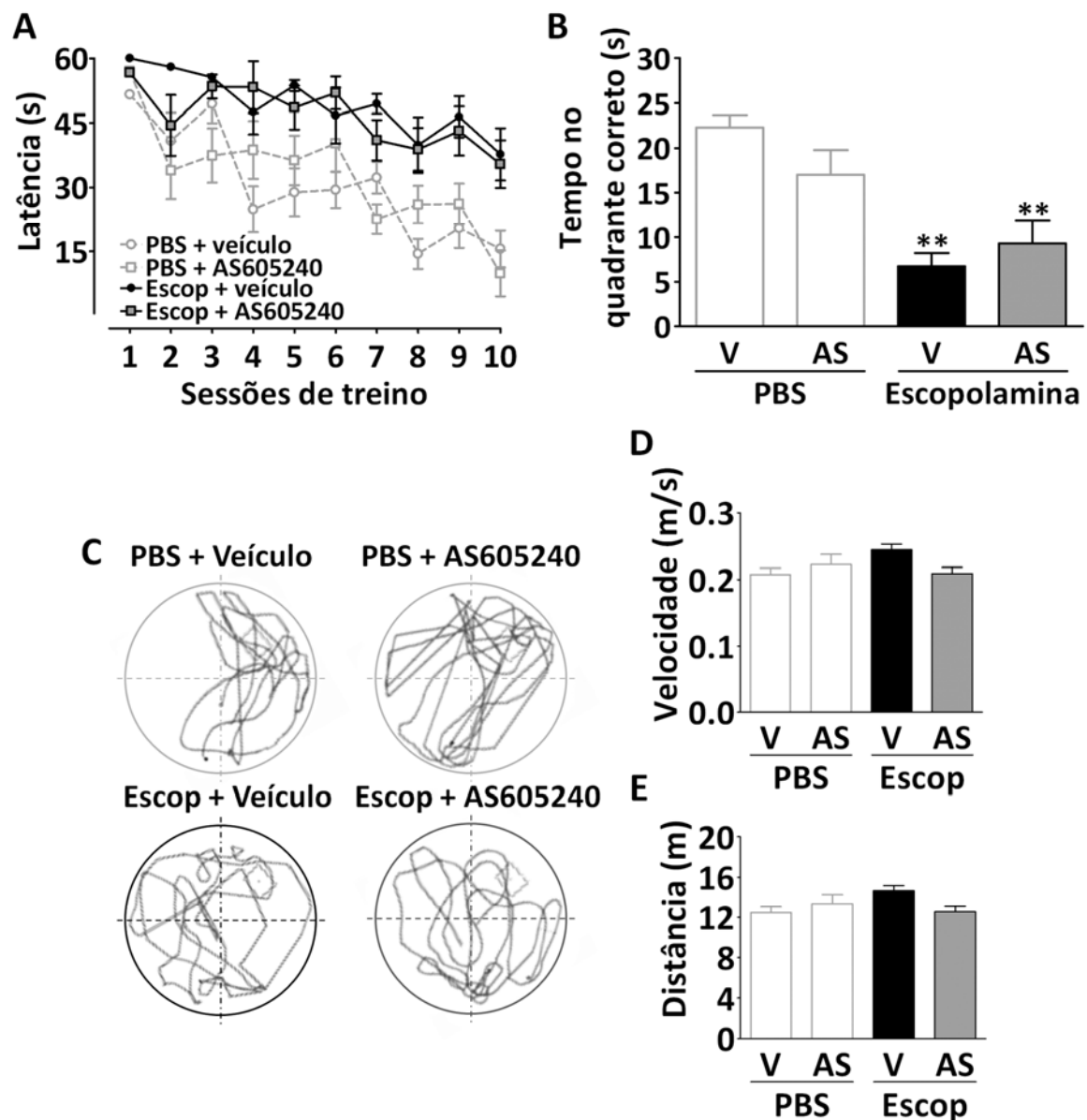


Figura 17 – Efeito do AS605240 sobre o dano cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos. O AS605240 (30 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes da injeção i.p. de escopolamina (Escop; 1 mg/Kg). Animais tratados com veículo (V; PBS, v.o.) foram utilizados como controle. Os diferentes grupos foram treinados e testados no labirinto aquático de Morris, respectivamente, 30 min e 24 h após a injeção de escopolamina ou PBS. (A) Tempo (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris durante a sessão de treino. (B) Tempo gasto no quadrante correto, (C) trajetória de nado, (D) velocidade e (E) distância percorrida dos animais no labirinto aquático de Morris durante a sessão de teste. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 8/grupo). **P < 0,01 comparado ao grupo PBS/veículo.

DISCUSSÃO

Do ponto de vista imunológico, o cérebro é um órgão incomum. Inicialmente, a ausência de reações imunes no cérebro foi sugerida a partir de estudos demonstrando que tecidos heterólogos transplantados no cérebro são menos suscetíveis à rejeição do que aqueles transplantados em outros órgãos (Medawar, 1948; Barker e Billingham, 1977; Togo et al., 2002). Estes estudos contribuíram para que o cérebro fosse considerado um órgão imunologicamente privilegiado, onde a presença da barreira hematoencefálica permitiria sua compartimentalização e seria capaz de prevenir o influxo de elementos celulares e humorais do sistema imune presentes no sangue. Contudo, estudos conduzidos a partir da década de 80 do século passado vêm contribuindo para mudar este conceito, ao demonstrar importantes interações entre o sistema imune e o sistema nervoso central (Wekerle et al., 1986; 1987; Hickey e Kimura, 1988; Akiyama et al., 2000). Atualmente, sabe-se que a maioria das moléculas envolvidas nas respostas imunes pode ser produzida no próprio sistema nervoso central, e que este sofre a infiltração de leucócitos continuamente (Akiyama et al., 2000; Rebenko-Moll et al., 2006).

A resposta inflamatória associada ao sistema nervoso central, ou neuroinflamação, difere em alguns pontos daquela observada em tecidos periféricos, uma vez que os sinais clássicos da mesma (rubor, tumor, calor e dor) não são observados. A presença da barreira hematoencefálica interfere no desenvolvimento das alterações vasculares comumente observadas na periferia. Além disso, o cérebro não apresenta fibras sensoriais, o que impossibilita a detecção de dor e calor. A barreira hematoencefálica é capaz também de reduzir substancialmente a entrada de células inflamatórias, patógenos e de algumas

macromoléculas no tecido cerebral. Deste modo, no sistema nervoso central a inflamação se desenvolve como um processo peculiar e silencioso, sem a presença dos sinais clássicos observados na periferia (Tuppo e Arias, 2005). Em circunstâncias normais, a inflamação, que constitui uma peça chave das respostas imunes inatas, tem a função de remover materiais estranhos ou patógenos e promover o reparo tecidual, apresentando papel benéfico para os indivíduos. Em contrapartida, quando a resposta inflamatória perde seu caráter autolimitado e torna-se crônica, ela pode causar graves efeitos ao organismo (Correale e Villa, 2004). Neste sentido, a neuroinflamação tem sido apontada como um fator comum que pode determinar a progressão de diferentes doenças neurodegenerativas (Block e Hong, 2005; Dheen et al., 2007).

Inúmeros estudos têm demonstrado que, além dos aspectos neuropatológicos característicos, o cérebro de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer apresenta sinais evidentes da ativação do processo inflamatório (Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray 2006; Schwab e McGeer, 2008). No entanto, o papel da inflamação no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer ainda é pouco compreendido. Estudos epidemiológicos revelam que indivíduos que fizeram ou fazem uso prolongado de antiinflamatórios não-esteroidais apresentam menor risco no desenvolvimento da doença de Alzheimer, sugerindo que o processo neuroinflamatório pode contribuir para a progressão desta patologia (Rogers et al., 1993; Zandi et al., 2002; McGeer e McGeer, 2007). Além disso, alguns trabalhos têm sugerido uma associação entre polimorfismos em genes para citocinas e outras moléculas inflamatórias e a doença de Alzheimer (Wyss-Coray, 2006). Entretanto, foi demonstrado recentemente que a relação entre o processo inflamatório e a progressão da doença de Alzheimer parece não

ser tão simples quanto se imaginava. Wyss-Coray e colaboradores (2001) evidenciaram que alguns aspectos da resposta imunológica parecem ser importantes para a fagocitose dos fragmentos amilóides depositados no cérebro. Neste estudo, realizado em camundongos que expressam uma forma mutada da APP humana, foi verificado que a produção da citocina fator de crescimento transformador beta-1 (TGF β 1) pelos astrócitos aumenta a atividade fagocítica da micróglia, reduzindo significativamente a formação de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares nas regiões hipocampal e cortical do cérebro. Neste mesmo modelo animal, o bloqueio da ativação da proteína C3 do sistema complemento tem efeito inverso, resultando no aumento da deposição de A β e da degeneração neuronal (Wyss-Coray et al., 2002). Estes dados demonstram claramente que os mediadores envolvidos na resposta inflamatória podem apresentar papéis moduladores distintos durante a progressão da doença de Alzheimer.

As células da glia apresentam funções importantes no sistema nervoso central, constituindo o principal tipo celular responsável pela função de defesa, e parecem desempenhar papel fundamental no processo inflamatório associado à doença de Alzheimer. O nome glia, derivado de uma palavra de origem grega que significa “cola”, reflete as funções inicialmente atribuídas a estas células, de suporte, nutrição e proteção neuronal (Miller, 2005). Essas células, que podem superar em até 10 vezes o número de neurônios em algumas áreas do cérebro humano, se dividem em três grupos: os astrócitos, os oligodendrócitos e as células da micróglia (Bradford, 1985). Os oligodendrócitos são responsáveis pela produção de mielina, facilitando a condução rápida de potenciais de ação através do isolamento de axônios neuronais, além de promover suporte trófico aos

neurônios (Barres, 2008). Os astrócitos, que são o grupo de células mais comum, são essenciais na comunicação glia-neurônio, manutenção da homeostasia iônica, secreção de fatores neurotróficos e participando da barreira hematoencefálica (Volterra e Meldolesi, 2005). Composta por células derivadas de progenitores mielóides que migram para o sistema nervoso central durante seu desenvolvimento, a micróglia compreende cerca de 10% das células da glia (Santambrogio et al., 2001; Soulet e Rivest, 2008). A micróglia exerce papel importante na defesa do sistema nervoso central, orquestrando as respostas imunes. Alterações em cada um destes tipos celulares foram documentadas através de estudos em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, bem como em culturas celulares e em modelos animais desta patologia (McGeer e McGeer, 2002). Anormalidades na atividade dos astrócitos, incluindo disfunção no transporte de glutamato, perturbações na regulação do cálcio e a produção elevada de citocinas, podem contribuir para a disfunção sináptica e morte neuronal (Mattson, 2004). Além disso, durante a doença de Alzheimer observa-se grande número de células microgliais e astrócitos associados às placas amilóides e neurônios em degeneração. Acredita-se que essas células participam da produção de toxinas e citocinas inflamatórias que, por sua vez, podem contribuir para o processo neurodegenerativo (McGeer e McGeer, 2002; Farfara et al., 2008).

Inúmeros estudos indicam que os processos de deposição de A β , formação de emaranhados neurofibrilares e de dano neuronal que ocorrem durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer desencadeiam a ativação e recrutamento das células da glia residentes no sistema nervoso central (Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray e Mucke, 2002). Contudo, os mecanismos responsáveis

pelo recrutamento e ativação de células gliais, bem como o papel destes eventos na doença de Alzheimer ainda não são totalmente conhecidos.

As quimiocinas e seus receptores têm papel fundamental no processo inflamatório, uma vez que coordenam a migração de células imunes para os sítios de inflamação. No sistema nervoso central, tanto a inflamação aguda quanto a crônica é acompanhada por um aumento na expressão destas proteínas (Cartier et al., 2005). A lista de quimiocinas e receptores descritos no cérebro de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer é extensa, no entanto, o número de estudos descrevendo a função destes mediadores é pequeno. Com o objetivo de verificar o possível envolvimento da quimiocina MIP-1 α , do receptor CCR5 e da via de sinalização intracelular PI3K γ na doença de Alzheimer, foi verificado o efeito do bloqueio genético ou farmacológico destas proteínas sobre as alterações moleculares e comportamentais induzidas pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.

A MIP-1 α é uma das principais quimiocinas expressas durante a inflamação do sistema nervoso central (Mennicken et al., 1999). Na doença de Alzheimer, a expressão aumentada desta quimiocina foi descrita em neurônios e em células da micróglia (Xia et al., 1998). Além disso, estudos *in vitro* descreveram a expressão da MIP-1 α também por células da micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e monócitos/macrófagos estimulados com peptídeos A β (Fiala et al., 1998; Johnstone et al., 1999; Meda et al., 1999; Lue et al., 2001; El Khoury et al., 2003). Os dados do presente estudo estendem aqueles existentes na literatura, indicando que a injeção i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ é capaz de promover aumento rápido e sustentado do RNAm para a MIP-1 α no hipocampo de camundongos. Entretanto, não foi possível observar alterações significativas nos níveis

hipocampais do RNAm para o CCR5, um dos receptores para a MIP-1 α , após a administração de A β ₁₋₄₀, embora o aumento da expressão deste receptor tenha sido demonstrado em monócitos tratados com peptídeos A β *in vitro*, e em células microgliais ativadas, muitas associadas a depósitos amilóides, em cérebros de indivíduos com doença de Alzheimer (Xia et al., 1998).

Com o objetivo de verificar se o aumento tempo-dependente do RNAm para a MIP-1 α induzido pela injeção i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ é acompanhada pelo aumento do número de células gliais ativadas, foram avaliados no hipocampo os níveis das proteínas GFAP e CD68. Na doença de Alzheimer, assim como em outras condições patológicas do sistema nervoso central, os astrócitos se tornam reativos, apresentando hipertrofia, além de síntese aumentada de GFAP. O GFAP, que é a principal proteína de filamento intermediário observada no citoesqueleto destas células, é um marcador amplamente utilizado para a verificação de sua ativação (Bignami et al., 1972; Eng et al., 2000). De maneira semelhante, as células da microglia, que em condições fisiológicas normalmente se encontram em estado quiescente e apresentam características morfológicas que incluem soma pequeno e processos ramificados, sofrem uma série de modificações após sua ativação, adquirindo um fenótipo amebóide (Kreutzberg, 1996; Town et al., 2005). Além disso, estas células apresentam aumento da expressão de algumas moléculas de superfície celular e adquirem função fagocítica, que pode ser avaliada através do aumento da expressão de CD68, uma proteína presente principalmente na membrana lisossomal (Verbeek et al., 1995; Town et al., 2005). De maneira interessante, foi possível verificar aumento tempo-dependente do número de células positivas para GFAP e CD68 no hipocampo de animais que receberam o peptídeo A β ₁₋₄₀ por via i.c.v., com o

aumento da expressão de GFAP precedendo o de CD68. Estes resultados fornecem evidências moleculares convincentes que confirmam e estendem os dados existentes na literatura, indicando que a injeção intracerebral de peptídeos A β promove o acúmulo de astrócitos e células microgliais ativados (Yan et al., 2001; El Khoury et al, 2003; Simard et al., 2006; Medeiros et al., 2007; Kim et al., 2008). Recentemente, Simard e colaboradores (2006) demonstraram que células microgliais derivadas da medula óssea podem ser observadas no hipocampo de camundongos 7 dias após o tratamento com A β_{1-40} ou A β_{1-42} , sugerindo que o aumento do número de células microgliais ativadas observado no presente estudo pode envolver tanto células residentes quanto células recrutadas periféricamente.

O envolvimento do receptor CCR5 no recrutamento da micróglia vem sendo descrito em camundongos em resposta à infecção por proteínas príon (Marella e Chabry, 2004) e dano cerebral (Carbonell et al., 2005). Além disso, o bloqueio farmacológico deste receptor reduz o número de astrócitos e micróglia ativados no hipocampo de ratos submetidos à infusão i.c.v. crônica de lipopolissacarídeo, um modelo de neuroinflamação crônica que reproduz muitas das alterações comportamentais e neuropatológicas associadas à doença de Alzheimer (Rosi et al., 2005). Os dados do presente estudo demonstram que o CCR5, e em menor extensão o ligante MIP-1 α , desempenham importante papel no acúmulo de células gliais ativadas induzido pela A β_{1-40} no hipocampo de camundongos, uma vez que a deleção gênica destas proteínas resultou na redução significativa do número de células positivas para GFAP e CD68. Em conjunto com os dados da literatura, os resultados do presente estudo permitem sugerir que a quimiocina MIP-1 α e o receptor CCR5 podem modular o aumento

do número de astrócitos e micróglia ativados observado na doença de Alzheimer.

A via PI3K desempenha papel primordial no processo de migração celular (Rommel et al., 2007). Foi demonstrado recentemente que a ativação dos receptores de quimiocinas promove aumento no recrutamento da PI3K que, por sua vez, modula diferentes alvos na membrana e no citoplasma celular, incluindo as proteínas Akt, quinase ativada por p21 (PAK) e Rac (Weiss-Haljiti et al., 2004). A ativação de tais proteínas desencadeia uma série de eventos que culminam na polarização de *rafts* lipídicos e das cadeias de actina e miosina, permitindo que a célula migre para os tecidos (Gomez-Mouton et al., 2004). Além disso, estudos com animais modificados geneticamente confirmam que a ausência da PI3K prejudica a migração de macrófagos e de neutrófilos induzida por diferentes agentes quimiotáticos (Hirsch et al., 2000; Li et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Os resultados do presente estudo indicam o envolvimento da via da PI3K no controle do processo de migração celular no sistema nervoso central. O bloqueio farmacológico da PI3K com o uso do AS605240 resultou em redução significativa do número de células positivas para GFAP e CD68 no hipocampo, indicando diminuição do acúmulo de células gliais ativadas. Estes dados são de grande importância, pois mostram pela primeira vez o envolvimento da PI3K no processo de migração celular em um modelo de doença de Alzheimer, bem como o potencial terapêutico do AS605240 para o tratamento dessa patologia.

O papel preciso do acúmulo de células gliais ativadas observado na doença de Alzheimer ainda não foi totalmente estabelecido. Em resposta aos peptídeos A β , micróglia e astrócitos produzem vários mediadores inflamatórios e neurotóxicos, que podem contribuir para a neurodegeneração, incluindo, por

exemplo, citocinas como TNF- α e IL-1 β , quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, dentre outros (McGeer & McGeer, 1995, 2001; Moore e O'Banion, 2002; Block e Hong, 2005). Por outro lado, a micróglia produz enzimas proteolíticas capazes de degradar os peptídeos A β (Leissring et al., 2003; Yan et al., 2006) e promove a remoção de A β através da fagocitose (Rogers e Lue, 2001; Simard et al., 2006), além de secretar agentes neurotróficos (Nguyen et al., 2002), sugerindo que estas células têm papel neuroprotetor na doença de Alzheimer. De fato, o bloqueio do acúmulo de células microgлияis em animais com deleção gênica do CCR2 que expressam uma forma mutada da APP humana promove um aumento da mortalidade, possivelmente devido ao acúmulo de A β em pequenos vasos sanguíneos (El Khoury, 2007). Efeitos benéficos também foram descritos para os astrócitos, que podem contribuir para a metabolização dos peptídeos A β (DeWitt et al., 1998; Wyss-Coray et al., 2003). Contudo, quando a ativação da micróglia não é capaz de remover os peptídeos A β , esta resposta pode acabar se tornando crônica e neurotóxica. Recentemente, foi observado em um modelo animal de doença de Alzheimer que durante a progressão da patologia, a micróglia se torna disfuncional e apresenta expressão reduzida de enzimas proteolíticas e receptores envolvidos na fagocitose, enquanto que a capacidade de produzir citocinas como a IL-1 β e o TNF- α se mantém inalterada (Hickman et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram ainda que o próprio TNF- α e o interferon- γ podem estar envolvidos na redução da captação e da degradação de peptídeos A β , uma vez que estas citocinas reduzem a expressão de proteínas envolvidas nestes processos em células da micróglia e macrófagos (Hickman et al., 2008; Yamamoto et al., 2008).

No sistema nervoso central, a enzima iNOS está normalmente ausente em tecidos saudáveis. Contudo, em condições patológicas como a doença de Alzheimer, ocorre aumento de sua expressão e, conseqüentemente, da produção de óxido nítrico, principalmente nos astrócitos, micróglia e neurônios (Heneka et al., 2001; Fernández-Vizarra et al., 2004). O óxido nítrico exerce importantes efeitos neurotóxicos, predominantemente através de sua reação com o ânion superóxido e a conseqüente produção da substância citotóxica peroxinitrito, capaz de promover modificações em diferentes proteínas (Koppal et al., 1999; Mander e Brown, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a deleção gênica da iNOS em animais que expressam formas mutadas de APP e presenilina-1 resulta em proteção contra a mortalidade prematura e a formação de placas amilóides (Nathan et al., 2005). De maneira similar, nosso grupo de pesquisa observou que a indução da iNOS exerce papel fundamental no estabelecimento do dano sináptico e das alterações comportamentais induzidas pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos (Medeiros et al., 2007). Confirmando dados anteriores de nosso grupo de pesquisa (Medeiros et al., 2007), foi possível observar através da análise de *western blot* que a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ resultou em aumento tempo-dependente dos níveis hipocámpais de iNOS em camundongos, aumento este que parece ser dependente da quimiocina MIP-1 α e do receptor CCR5.

As enzimas ciclooxigenases (COXs) são o principal alvo dos antiinflamatórios não-esteroidais e são enzimas responsáveis pela síntese de prostanóides. Existem duas isoformas de COX, denominadas COX-1 e COX-2 (Simmons et al., 2004; Warner e Mitchell, 2004). A COX-1 está expressa de forma constitutiva na maior parte dos tecidos apresentando funções fisiológicas. Em contrapartida, a COX-2 normalmente está ausente em condições homeostáticas,

demonstrando expressão elevada mediante condições patológicas. Diferentes moléculas podem desencadear o aumento na expressão da COX-2, incluindo fatores de crescimento, agentes bacterianos, radiação ultravioleta e citocinas (Simmons et al., 2004). De maneira importante, inúmeros trabalhos indicam que a expressão da COX-2 pode ser modulada por peptídeos A β . Neste sentido, foi demonstrado no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer aumento nos níveis de RNAm para a COX-2 no córtex (Pasinetti e Aisen, 1998) e hipocampo (Ho et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a expressão da proteína COX-2 está aumentada em neurônios e células da glia (Pasinetti e Aisen, 1998; Hoozemans et al., 2001), e que os níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) estão aumentados no líquido cefalorraquidiano de indivíduos portadores de doença de Alzheimer (Montine et al., 1999). A expressão da COX-2 pode ser induzida ainda em astrócitos obtidos de ratos, através do tratamento com peptídeos amilóides *in vitro* (Hüll et al., 2006), ou no *nucleus basalis* de ratos (Giovannini et al., 2002) e no hipocampo de camundongos (Cakala et al., 2007) após o tratamento *in vivo* com o peptídeo A β ₁₋₄₂. Finalmente, foi demonstrado que a expressão de COX-2 seletivamente em neurônios resulta em aumento da formação de placas senis em camundongos que expressam formas mutadas de APP e presenilina-1 (Xiang et al., 2002). Por outro lado, o bloqueio farmacológico da COX-2 ou a deleção gênica do receptor EP₂ para prostaglandina reduz sintomas cognitivos ou ainda o dano oxidativo e os níveis de A β , respectivamente, em modelos animais da doença de Alzheimer (Liang et al., 2005; Cakala et al., 2007). Os dados descritos no presente estudo indicam que a COX-2 apresenta perfil de expressão semelhante ao da iNOS, com aumento tempo-dependente observado entre um e oito dias após a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀. Assim como verificado para a

iNOS, a COX-2 também tem seu aumento dependente da produção da MIP-1 α e da ativação do CCR5, uma vez que animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$ e CCR5 $^{-/-}$ apresentaram níveis reduzidos da enzima quando comparados aos animais C57Bl/6 (+/+). Além disso, estes efeitos parecem estar relacionados à ativação da via PI3K γ , já que o tratamento com AS605240 resultou em redução significativa na indução da COX-2 pela A β_{1-40} no hipocampo de camundongos. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que o acúmulo de células gliais ativadas no hipocampo, orquestrado por MIP-1 α e CCR5 possivelmente através da ativação da PI3K γ , parece ser um evento fundamental para a expressão de proteínas inflamatórias como a iNOS e a COX-2, contribuindo para o estabelecimento do processo inflamatório induzido pelo peptídeo A β_{1-40} .

Recentemente, foi demonstrado que o receptor CCR5 está envolvido na ativação de fatores de transcrição no hipocampo durante a inflamação (Rosi et al., 2005). Além disso, a expressão das enzimas iNOS e COX-2 é finamente regulada no nível transcricional (Eberhardt et al., 1996; Kim e Fischer, 1998; Kleinert et al., 2004; Tatsanis et al., 2006). Deste modo, a MIP-1 α e o CCR5 poderiam influenciar a expressão da iNOS e da COX-2 através da ativação de fatores de transcrição cujo sítio de ligação está presente na região promotora dos genes que codificam estas enzimas, tais como NF- κ B, CREB e AP-1. Nos últimos anos, a via do fator de transcrição NF- κ B tem sido relacionada a uma grande variedade de patologias que apresentam componente inflamatório, tais como artrite reumatóide, asma, sepse, aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas (Barnes e Karin, 1997; Tak e Firestein, 2001; Garg e Aggarwal, 2002; Li e Verma, 2002; Burke, 2003; Camandola e Mattson, 2007). A ativação desse fator de transcrição pode ser observada em condições fisiológicas e em diversos estados patológicos

e está associada diretamente ao controle da expressão de várias proteínas da resposta inflamatória, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases, COX-2 e iNOS, dentre outras (Baichwal e Baeuerle, 1997; Tak e Firestein, 2001). Em mamíferos, a família NF- κ B/Rel é composta por cinco membros, p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel e Rel-B, que apresentam seqüência amino-terminal altamente conservada de 300 aminoácidos, necessários à sua dimerização, localização nuclear e ligação do fator de transcrição ao DNA (Baeuerle e Henkel, 1994; Ghosh e Karin, 2002; Li e Verma, 2002). Estas proteínas formam homo ou heterodímeros, sendo o heterodímero formado pelas subunidades p50 ou p52 com p65 (RelA) a forma mais ativa do NF- κ B. Os dímeros são mantidos inativos no citoplasma através da interação com moléculas inibitórias, as proteínas inibitórias- κ B (I κ B), que mascaram o sítio de localização nuclear do NF- κ B, evitando assim sua migração para o núcleo celular (Whiteside e Israel, 1997; Malek et al., 2001; Karin et al., 2004). A translocação do NF- κ B pode ser induzida por diversos estímulos incluindo citocinas, infecção, dano e estresse, entre outros (Pahl, 1999). A estimulação celular resulta na ativação do complexo de proteínas I κ B quinases (IKKs), composto por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma subunidade regulatória IKK γ (Rothwarf e Karin, 1999; Karin e Ben-Neriah, 2000). Após a estimulação, este complexo promove a fosforilação de duas serinas amino-terminais presentes nas I κ Bs, levando à sua ubiquitinação e degradação pelo proteasoma (Ghosh e Karin, 2002). Isso permite a translocação do NF- κ B livre do citoplasma para o núcleo e sua associação com regiões promotoras de uma série de genes, regulando sua transcrição (Barnes e Karin, 1997; Sun e Andersson, 2002; Karin et al., 2004). No sistema nervoso central, o NF- κ B está

implicado em processos fisiológicos e patológicos, e dímeros funcionais estão presentes em neurônios, astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (Mémet, 2006). Diversas evidências indicam que este fator de transcrição está envolvido no processo de plasticidade sináptica (Kaltschmidt et al., 2005; Meffert e Baltimore, 2005). Albensi e Mattson (2000) observaram que o bloqueio da via do NF- κ B previne a indução de LTP no hipocampo. Além disso, quando a ativação do NF- κ B é bloqueada seletivamente em neurônios, ocorre comprometimento da fase tardia da LTP e da indução da depressão de longo prazo (LTD) (Kaltschmidt et al., 2006). Foi demonstrado ainda que a deleção gênica da subunidade p65 NF- κ B resulta em déficits significativos de aprendizado, sugerindo a participação deste fator de transcrição nos processos cognitivos (Meffert et al., 2003). Resultados similares foram observados em animais que sofreram bloqueio da via do NF- κ B, que apresentaram prejuízos na memória de longo prazo (Dash et al., 2005; Kaltschmidt et al., 2006). Por outro lado, este fator de transcrição é apontado como um importante mediador das respostas imunológica e inflamatória no cérebro, uma vez que exerce papel essencial na ativação de células gliais (O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Kaltschmidt et al., 2005; Mémet, 2006). No cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, foi observado aumento da ativação do NF- κ B em neurônios e células da glia próximos a placas amilóides (Teraï et al., 1996; Boissiere et al., 1997; Kaltschmidt et al., 1997). Em astrócitos obtidos de ratos e em células microgliais humanas, foi demonstrado que o aumento da expressão de proteínas envolvidas na inflamação induzido por peptídeos A β ocorre através de mecanismos dependentes do NF- κ B (Akama et al., 1998; Walker et al., 2001). Além disso, a inibição da atividade do NF- κ B na micróglia bloqueia a o efeito

neurotóxico dos peptídeos A β (Chen et al., 2005). Estes dados sugerem que a ativação do NF- κ B em células gliais modula a neurotoxicidade dos peptídeos A β .

O fator de transcrição AP-1 é composto por homo ou heterodímeros de membros das famílias c-Jun e c-Fos e regula a expressão de um grande número de proteínas envolvidas na diferenciação, proliferação e apoptose celular, respostas imunes e inflamação (Karin, 1995; Kaminska et al., 2000; Shaulian e Karin, 2002; Ameyar et al., 2003). Ao contrário do NF- κ B, o AP-1 está expresso nas células em baixas quantidades. Em resposta a estímulos como radiação ultravioleta, citocinas e fatores de crescimento, ocorre aumento na expressão dos genes que codificam as proteínas c-Jun e c-Fos, aumentando assim os níveis de AP-1 (Karin, 1995, Karin et al., 1997). No cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, foram observados níveis aumentados de c-jun, principalmente em neurônios que apresentavam danos no DNA e/ou apoptose (Anderson et al., 1994; 1996) e em células gliais associadas a placas amilóides (Ferrer et al., 1996). Foi observada ainda a indução da c-jun em neurônios, e a ativação do AP-1 em oligodendrócitos após a exposição a peptídeos A β *in vitro* (Estus et al., 1997; Xu et al., 2001). De maneira interessante, o bloqueio da ativação deste fator de transcrição em culturas neuronais é capaz de inibir a toxicidade dos peptídeos A β (Bozyczko-Coyne et al., 2001; Morishima et al., 2001; Troy et al., 2001). Recentemente, um estudo conduzido por Jang e Surh (2005) demonstrou que a expressão da iNOS induzida por A β em células PC12 é regulada pelo AP-1, sugerindo que este fator de transcrição está envolvido na indução de proteínas inflamatórias na doença de Alzheimer.

O fator de transcrição CREB regula diversos genes através da ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CRE) presente na região promotora destes

genes. No sistema nervoso central, o CREB tem sido relacionado à regulação da sobrevivência neuronal, proliferação de precursores, crescimento de neuritos e diferenciação neuronal (Lee et al., 1999, Lonze e Ginty, 2002, Redmond et al., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que este fator de transcrição está envolvido nas funções de aprendizado e memória (Guzowski and McGaugh, 1997). Na doença de Alzheimer, tem sido descrita redução da atividade do CREB no cérebro de indivíduos afetados e em modelos animais (Yamamoto-Sasaki et al., 1999, Dineley et al., 2001, Liang et al., 2007). No entanto, Dinelay e colaboradores (2001) observaram que a ativação do CREB no hipocampo varia conforme a progressão das alterações patológicas em animais transgênicos que expressam uma forma mutada da APP, com ativação elevada aos 13 meses, seguida por uma redução aos 20 meses de idade.

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa indicam que a injeção i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ é um estímulo capaz de promover a ativação tempo-dependente de NF- κ B, AP-1 e CREB no hipocampo de camundongos. De maneira importante, a expressão de iNOS e COX-2 induzida pelo A β ₁₋₄₀ no hipocampo é dependente da ativação destes fatores de transcrição (Medeiros et al., 2007, Medeiros et al., resultados não publicados). Tem sido demonstrado que reações de fosforilação regulam a atividade do NF- κ B, AP-1 e CREB (Xing et al., 1998; Kyriakis e Avruch, 2001; Ghosh e Karin, 2002). Dessa forma, a avaliação dos níveis de p65, CREB e c-Jun fosforilados no hipocampo sugere que tanto a MIP-1 α quanto o CCR5 exercem um papel importante na ativação de diferentes fatores de transcrição envolvidos na expressão de proteínas importantes para o estabelecimento da resposta inflamatória.

A ausência de MIP-1 α ou de CCR5, ou ainda o bloqueio da via PI3K γ poderiam resultar na redução do acúmulo de células gliais ativadas e do processo inflamatório através de diferentes mecanismos, incluindo efeitos sobre a migração ou sobre a ativação celular. Para investigar a participação destes mecanismos, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais. De forma interessante, macrófagos isolados de camundongos com deleção gênica do receptor CCR5 apresentaram migração reduzida em resposta ao sobrenadante de células estimuladas com A β_{1-40} . Além disso, o sobrenadante obtido a partir de macrófagos de camundongos com deleção gênica da MIP-1 α estimulados com o peptídeo A β_{1-40} apresentou menor capacidade de estimular a quimiotaxia celular. De maneira relevante, a ausência da MIP-1 α e do CCR5 não interferiu na quimiotaxia induzida pela anafilotoxina C5a. Estes resultados sugerem que a produção de MIP-1 α e a ativação do CCR5 são eventos importantes para a migração celular induzida por A β_{1-40} em camundongos. Com o objetivo de verificar o efeito desta quimiocina e seu receptor na ativação celular, foi avaliada a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β . Os dados do presente estudo demonstram que o peptídeo A β_{1-40} e outros estímulos como LPS e C5a foram capazes de induzir aumento da expressão de TNF- α e IL-1 β por células obtidas de camundongos da linhagem selvagem (C57Bl/6, +/+), CCR5^{-/-} ou MIP-1 α ^{-/-} de maneira similar. Em outra série de experimentos, foi verificado que o inibidor da PI3K γ AS605240, na mesma faixa de concentração em que reduziu a quimiotaxia celular induzida pelo meio de cultura de macrófagos estimulados com A β_{1-40} ou pela C5a, não foi capaz de modular o aumento na expressão das citocinas TNF- α e IL-1 β induzido pelos tratamentos com LPS, C5a ou A β_{1-40} . Em conjunto, os dados do presente estudo permitem sugerir que a quimiocina MIP-1 α e o receptor

CCR5, possivelmente através da ativação da via PI3K γ , participam especificamente do controle do processo de migração celular induzido por peptídeos amilóides, sem interferir diretamente na expressão das proteínas envolvidas na resposta inflamatória. Assim, a diminuição do processo inflamatório observada no cérebro de animais em virtude do bloqueio genético da MIP-1 α e CCR5 ou farmacológico da PI3K γ poderia ser resultado da migração reduzida de células da glia e, conseqüentemente, da produção de mediadores inflamatórios.

As funções de aprendizado e memória são vulneráveis a várias patologias, incluindo a doença de Alzheimer (Budson e Price, 2005). Nos estágios iniciais da doença, geralmente verifica-se perda da memória episódica e dificuldades na aquisição de novas habilidades, evoluindo gradualmente com prejuízos em outras funções cognitivas, tais como julgamento, cálculo, raciocínio abstrato e habilidades visuo-espaciais. Nos estágios intermediários, pode ocorrer afasia fluente, apresentando-se como dificuldade para nomear objetos ou para escolher a palavra adequada para expressar uma idéia, e também apraxia. Nos estágios terminais, encontram-se marcantes alterações do ciclo sono-vigília; alterações comportamentais, como irritabilidade e agressividade; sintomas psicóticos e; incapacidade de andar, falar e realizar cuidados pessoais (McKhann et al., 1984; Romanelli et al., 1990; Morris e Rubin, 1991; Mortimer et al., 1992; Walsh e Selkoe, 2004).

Diferentes modelos animais têm sido utilizados para caracterizar os processos celulares e moleculares envolvidos na perda da capacidade cognitiva durante a doença de Alzheimer (Gotz e Ittner, 2008). Até o momento foi determinado que o acúmulo de fragmentos amilóides, formação de emaranhados neurofibrilares e produção excessiva de proteínas da resposta inflamatória

resultam inicialmente na diminuição no número de espinhas dendríticas, progredindo para redução na quantidade das sinapses e em última instância na morte neuronal (Selkoe, 2000). Contudo, evidências recentes sugerem que formas intermediárias no processo de acúmulo de fragmentos amilóides, particularmente estruturas oligoméricas da A β , podem ser importantes efetores da neurotoxicidade na doença de Alzheimer (Haass e Selkoe, 2007; Roychaudhuri et al., 2009; Yankner e Lu, 2009). De maneira importante, foi observado que formas oligoméricas da A β são capazes de inibir a LTP no hipocampo *in vitro* e *in vivo*, além de promover a morte neuronal (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002; Townsend et al., 2006). Corroborando dados anteriores (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008), os resultados do presente estudo demonstram que uma única administração i.c.v. de peptídeos A β ₁₋₄₀ previamente agregados resulta em prejuízos cognitivos importantes, conforme avaliação no teste do labirinto aquático. Além disso, estas alterações cognitivas estão associadas à redução da integridade sináptica no hipocampo, o que suporta a premissa de que o dano cognitivo está associado à disfunção sináptica (Selkoe, 1991). O teste do labirinto aquático, proposto originalmente por Morris e colaboradores (1982), é uma ferramenta amplamente utilizada para o estudo de aprendizado e memória em roedores (D'Hooge e De Deyn, 2001). Na versão de memória espacial de referência do labirinto aquático, os roedores aprendem a escapar para uma plataforma submersa mantida no mesmo local do labirinto do início ao final dos experimentos. Nessa situação, os animais precisam fazer associações entre as pistas visuais do ambiente para formar um mapa cognitivo que os ajuda a encontrar a plataforma (Morris et al., 1982). De maneira importante, tem sido extensivamente documentado que o aprendizado e a memória espacial são

dependentes da integridade do hipocampo (DiMattia e Kesner, 1988; Bolhuis et al., 1994; Cho et al., 1999; Broadbent et al., 2006).

Os mecanismos exatos responsáveis pelos prejuízos cognitivos induzidos pela administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos ainda são pouco conhecidos. Dados recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a indução do processo inflamatório é um evento importante para o estabelecimento dos déficits de aprendizado e memória induzidos pela administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$. Foi observado que o $A\beta_{1-40}$ estimula a produção de $TNF-\alpha$, que por sua vez induz o aumento da expressão da iNOS, resultando na disfunção sináptica e no dano cognitivo (Medeiros et al., 2007). Outros eventos importantes para o estabelecimento das alterações comportamentais induzidas pela administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ em camundongos são a ativação e a regulação da expressão de receptores B_1 e B_2 para as cininas (Prediger et al., 2008). Estendendo estes resultados, o presente estudo demonstra que camundongos com deleção gênica de $MIP-1\alpha$ ou $CCR5$ são menos suscetíveis ao dano cognitivo induzido pela $A\beta_{1-40}$, como verificado pelas menores latências para encontrar a plataforma durante a sessão de treino e aumento da preferência pelo quadrante correto durante a sessão de teste em comparação aos animais da linhagem selvagem. Nossos resultados demonstraram ainda que o tratamento com AS605240 reduziu as alterações induzidas pela injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ no desempenho dos animais nas sessões de treino e teste do labirinto aquático de Morris. É importante destacar que os camundongos tratados com o peptídeo $A\beta_{1-40}$, não diferiram dos tratados com a solução controle nos parâmetros locomotores avaliados no labirinto aquático ou no teste do campo aberto, confirmando que a queda no desempenho

apresentada no labirinto aquático por estes animais é decorrente de prejuízo na função de memória espacial.

A análise imunoistoquímica da proteína sinaptofisina, presente em vesículas pré-sinápticas foi utilizada como medida de densidade sináptica (Masliah et al., 1990). Esta análise revelou que o bloqueio genético da MIP-1 α e do CCR5 resulta em proteção contra a disfunção sináptica induzida pela A β ₁₋₄₀, uma vez que a imunomarcação no hipocampo destes animais apresentou-se elevada em comparação à observada em animais da linhagem selvagem. De maneira interessante, foi possível observar efeito similar após o bloqueio farmacológico da PI3K γ . Estes dados indicam que a MIP-1 α , o CCR5 e a PI3K γ , proteínas importantes no desenvolvimento de respostas inflamatórias, são necessárias para o desenvolvimento da disfunção sináptica que ocorre em resposta à administração de A β ₁₋₄₀ e, conseqüentemente, dos prejuízos cognitivos induzidos pelo peptídeo.

O uso de inibidores não seletivos de PI3Ks em diferentes modelos animais tem implicado estas enzimas nas funções de aprendizado e memória (Barros et al., 2001; Lin et al., 2001; Liu et al., 2003; Chen et al., 2005). Recentemente, Tohda e colaboradores (2007) demonstraram que animais geneticamente modificados que não expressam a subunidade regulatória p85 α apresentam déficit de aprendizado e disfunção sináptica, sugerindo que membros da classe IA estão envolvidos nestas funções. Com o objetivo verificar um possível efeito direto da PI3K γ nas funções cognitivas, foi avaliado o papel desta enzima na amnésia induzida pela escopolamina. O tratamento com AS605240 não foi capaz de reduzir o déficit cognitivo promovido por este antagonista colinérgico. Este dado é de grande interesse, uma vez que a escopolamina causa efeito direto sobre o

processo de aprendizado e memória, modulando a aquisição e retenção da informação e causando um efeito amnésico nos animais, sem o envolvimento da resposta inflamatória (Ebert e Kirch, 1998). Desta forma, é possível afirmar que o efeito do bloqueio farmacológico da PI3K γ , bem como do bloqueio genético da MIP-1 α e do CCR5, sobre o dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀ está relacionado à capacidade que estas proteínas apresentam de regular o acúmulo de células gliais ativadas, que causariam a ativação da resposta inflamatória e o conseqüente prejuízo sináptico. De maneira importante, os dados do presente estudo também indicam que a administração do peptídeo inverso A β ₄₀₋₁ não foi capaz de promover qualquer alteração nos parâmetros moleculares e comportamentais avaliados, confirmando que os efeitos do peptídeo A β ₁₋₄₀ são específicos.

A relação entre quimiocinas e seus receptores é complexa, uma vez que uma única quimiocina pode se ligar a diferentes receptores, e um receptor pode ser ativado por múltiplas quimiocinas. Dessa forma, enquanto o CCR5 é responsável por alguns dos efeitos de MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, a MIP-1 α pode exercer suas ações também através da ativação do CCR1 (Viola e Luster, 2008). Esta promiscuidade pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças observadas nas respostas moleculares e comportamentais de animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$ e CCR5 $^{-/-}$. A interpretação dos resultados obtidos com o bloqueio farmacológico da PI3K γ também requer cautela, já que esta enzima participa da via de sinalização intracelular não só de receptores para quimiocinas, como também de receptores para outros fatores quimiotáticos como N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) e C5a (Rommel et al., 2007).

Em associação com dados da literatura, o presente estudo procurou caracterizar alguns dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo patológico induzido por peptídeos A β , como ilustrado na Figura 18. A administração i.c.v. da A β_{1-40} em camundongos resulta no acúmulo de células gliais ativadas (p. ex. células da micróglia residentes ou derivadas da periferia e astrócitos) em áreas cerebrais envolvidas no controle cognitivo, como o hipocampo (Simard et al., 2006; Medeiros et al., 2007), sendo este processo mediado pela produção da quimiocina MIP-1 α e ativação do receptor CCR5. O controle do processo de migração celular mediado pelas quimiocinas após a administração de A β_{1-40} é dependente da ativação da via PI3 γ , que controla a ativação de inúmeros segundos mensageiros (p. ex. Rac, Akt, PAK) envolvidos na regulação da polarização das cadeias de miosina e actina, necessárias para a migração. As células da glia ativadas produzem diferentes proteínas envolvidas na resposta inflamatória, como o TNF- α , que através do receptor TNFR1 induz a ativação de vias de sinalização intracelular das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e proteína quinase A (PKA), que por sua vez modulam os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e CREB (Medeiros et al., 2007; Medeiros et al., resultados não publicados). O aumento na atividade transcricional resulta em elevação na expressão das proteínas COX-2 e iNOS, sendo que a última contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Medeiros et al., 2007; Medeiros et al., resultados não publicados). Finalmente, o acúmulo destas substâncias envolvidas no processo inflamatório no hipocampo e córtex, desencadeado pela A β_{1-40} , resulta no processo de dano sináptico e, conseqüentemente, nos prejuízos cognitivos (Medeiros et al., 2007).

Em conclusão, o presente estudo demonstra pela primeira vez a participação da quimiocina MIP-1 α , do receptor CCR5 e da enzima PI3K γ na modulação da resposta inflamatória e do dano sináptico e cognitivo induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, sugerindo que estas proteínas podem exercer um importante papel nas alterações verificadas nos primeiros estágios da doença de Alzheimer. Estudos adicionais em outros modelos animais e em humanos visando o melhor entendimento da participação destas proteínas no desenvolvimento da patologia podem estabelecer alvos potenciais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

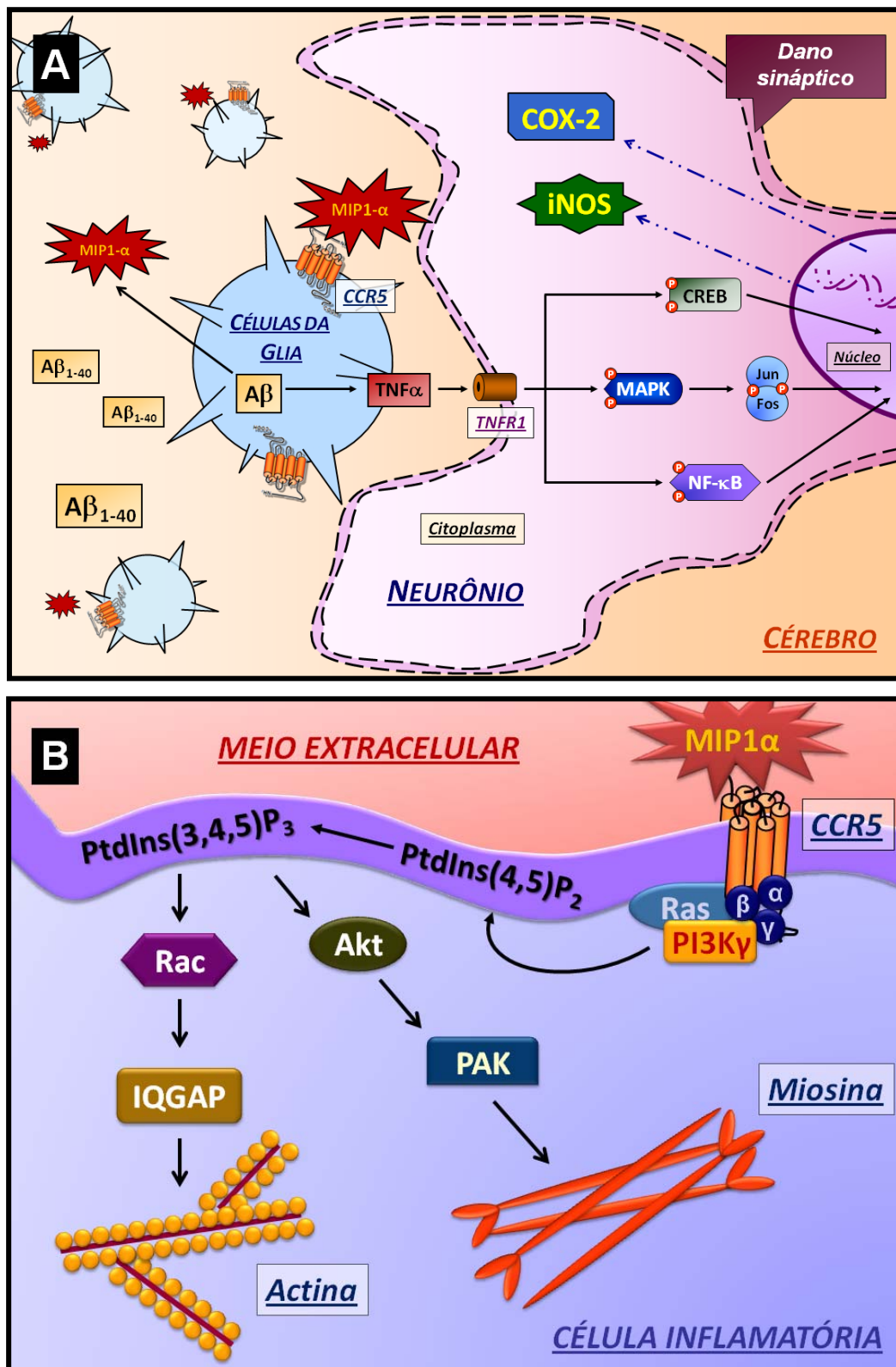


Figura 18 – Aspectos celulares e moleculares envolvidos no dano cognitivo induzido pelo peptídeo β -amilóide ($A\beta$)₁₋₄₀ em camundongos. (A) A administração intracerebroventricular de $A\beta$ ₁₋₄₀ induz o aumento na expressão da

quimiocina proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), que através do receptor de quimiocina CC 5 (CCR5) ativa o processo de migração celular para áreas envolvidas no processo cognitivo, como o hipocampo. As células da glia ativadas produzem a citocina fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que através do receptor do TNF1 (TNFR1) promove a ativação das vias de sinalização intracelular das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) e fator nuclear- κ B (NF- κ B), que por sua vez modulam a expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2). O acúmulo de substâncias produzidas durante a resposta inflamatória tem como resultado o dano sináptico e o déficit cognitivo. (B) A MIP-1 α e o CCR5 regulam a migração celular através da ativação da via fosfoinositídeo-3-quinase γ (PI3K γ), resultando na alteração da conformação celular necessária para este processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMA KT, ALBANESE C, PESTELL RG, VAN ELDIK LJ (1998) Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5795–5800.

AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, BRADT B, BAUER J, COLE GM, COOPER NR, EIKELENBOOM P, EMMERLING M, FIEBICH BL, FINCH CE, FRAUTSCHY S, GRIFFIN WS, HAMPEL H, HULL M, LANDRETH G, LUE L, MRAK R, MACKENZIE IR, MCGEER PL, O'BANION MK, PACHTER J, PASINETTI G, PLATA-SALAMAN C, ROGERS J, RYDEL R, SHEN Y, STREIT W, STROHMEYER R, TOOYOMA I, VAN MUISWINKEL FL, VEERHUIS R, WALKER D, WEBSTER S, WEGRZYNIAK B, WENK G, WYSS-CORAY T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383–421.

ALBENSI BC, MATTSON MP (2000) Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 35:151–159.

ALKHATIB G, COMBADIÈRE C, BRODER CC, FENG Y, KENNEDY PE, MURPHY PM, BERGER EA (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-1958.

AMEYAR M, WISNIEWSKA M, WEITZMAN JB (2003) A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85:747-752.

ANDERSON AJ, CUMMINGS BJ, COTMAN CW (1994) Increased immunoreactivity for Jun- and Fos-related proteins in Alzheimer's disease: association with pathology. *Exp Neurol* 125:286-295.

ANDERSON AJ, SU JH, COTMAN CW (1996) DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 16:1710-1719.

BAEUEERLE PA, HENKEL T (1994) Function and activation of NFkappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141–179.

BAGGIOLINI M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.

BAICHWAL VR, BAEUEERLE PA (1997) Activate NF- κ B or die? *Curr Biol* 7:R94-R96.

BALASHOV KE, ROTTMAN JB, WEINER HL, HANCOCK WW (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6873-6878.

BARBER DF, BARTOLOMÉ A, HERNANDEZ C, FLORES JM, REDONDO C, FERNANDEZ-ARIAS C, CAMPS M, RÜCKLE T, SCHWARZ MK, RODRÍGUEZ S, MARTINEZ-A C, BALOMENOS D, ROMMEL C, CARRERA AC (2005)

PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 11:933-935.

BARCELLOS LF, SCHITO AM, RIMMLER JB, VITTINGHOFF E, SHIH A, LINCOLN R, CALLIER S, ELKINS MK, GOODKIN DE, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA, HAUSER SL, OKSENBERG JR (2000) CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Genetics Group. Immunogenetics* 51:281-288.

BARKER CF, BILLINGHAM RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25:1-54.

BARNES PJ, KARIN M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071.

BARRES BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.

BARROS DM, MELLO E SOUZA T, DE SOUZA MM, CHOI H, DEDAVID E SILVA T, LENZ G, MEDINA JH, IZQUIERDO I (2001) LY294002, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase given into rat hippocampus impairs acquisition, consolidation and retrieval of memory for one-trial step-down inhibitory avoidance. *Behav Pharmacol* 12: 629–634.

BERNSTEIN HG, KEILHOFF G, REISER M, FREESE S, WETZKER R (1998) Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol* 44:973-983.

BIERNAT J, GUSTKE N, DREWES G, MANDELKOW EM, MANDELKOW E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.

BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D, UYEDA CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43:429-435.

BISWAS SK, SODHI A (2002) Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol* 2:1095-1107.

BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.

BLESSED G, TOMLINSON BE, ROTH M (1968) The association between quantitative measures of dementia and senile change in the cerebral grey matter elderly subjects. *Br J Psychiatry* 114:797-811

BLOCK ML, HONG JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98.

- BOISSIERE F, HUNOT S, FAUCHEUX B, DUYCKAERTS C, HAUW JJ, AGID Y, HIRSCH EC (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8:2849–2852.
- BOLHUIS J, STEWART CA, FORREST EM (1994) Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Q J Exp Psychol* 47:129–150.
- BOZYCZKO-COYNE D, O'KANE TM, WU ZL, DOBRZANSKI P, MURTHY S, VAUGHT JL, SCOTT RW (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem* 77:849–863.
- BRAAK H, DE VOS RA, JANSEN EN, BRATZKE H, BRAAK E (1998) Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res* 117:267–285.
- BRADFORD HF (1985) Glial Cells: Mechanical and Functional Supporting Cells of the Nervous System. Cap. 2, p. 62–110, In: *Chem Neurobiol*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- BRAMBLETT GT, GOEDERT M, JAKES R, MERRICK SE, TROJANOWSKI JQ, LEE VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10:1089–1099.
- BROADBENT NJ, SQUIRE LR, CLARK RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:187–91.
- BROOKMEYER R, JOHNSON E, ZIEGLER-GRAHAM K, ARRIGHI HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia J. of the Alzheimer's Association* 3:186–191.
- BUDSON AE, PRICE BH (2005) Memory dysfunction. *N Engl J Med* 352:692–699.
- BURKE JR (2003) Targeting I kappa B kinase for the treatment of inflammatory and other disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6:720–728.
- BUTTINI M, ORTH M, BELLOSTA S, AKEEFE H, PITAS RE, WYSS-CORAY T, MUCKE L, MAHLEY RW (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 19:4867–4880.
- BUXBAUM JD, LIU KN, LUO Y, SLACK JL, STOCKING KL, PESCHON JJ, JOHNSON RS, CASTNER BJ, CERRETTI DP, BLACK RA (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765–27767.
- CAKALA M, MALIK AR, STROSZNAJDER JB (2007) Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. *Pharmacol. Rep* 59:164–172.

CAMANDOLA S, MATTSON MP (2007) NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* 11:123-132.

CAMPS M, RUCKLE T, JI H, ARDISSONE V, RINTELEN F, SHAW J, FERRANDI C, CHABERT C, GILLIERON C, FRANCON B, MARTIN T, GRETENER D, PERRIN D, LEROY D, VITTE PA, HIRSCH E, WYMAN MP, CIRILLO R, SCHWARZ MK, ROMMEL C (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11:936-943.

CANTLEY LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.

CARBONELL WS, MURASE S, HORWITZ AF, MANDELL JW (2005) Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an in situ time-lapse confocal imaging study. *J Neurosci* 25:7040-7047.

CARDONA AE, LI M, LIU L, SAVARIN C, RANSOHOFF RM (2008) Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol* 84:587-594.

CARNEVALE KA, CATHCART MK (2003) Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem* 278:25317-25322.

CARTIER L, HARTLEY O, DUBOIS-DAUPHIN M, KRAUSE KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 48:16-42.

CHARO, IF, RANSOHOFF RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621.

CHEN J, ZHOU Y, MUELLER-STEINER S, CHEN LF, KWON H, YI S, MUCKE L, GAN L (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 280:40364-40374.

CHEN X, GARELICK MG, WANG H, LIL V, ATHOS J, STORM DR (2005) PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nat Neurosci* 8: 925-931.

CHO YH, FRIEDMAN E, SILVA AJ (1999) Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav Brain Res* 98:77-87.

CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACKAY CR, LAROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-1148.

CLARK CM (2000) Clinical manifestations and diagnostic evaluation of patients with Alzheimer's disease. Cap. 6, p. 95-114, In: *Neurodegenerative dementias. Clinical features and pathological mechanisms*. McGraw-Hill, New York, USA.

COOK DN, BECK MA, COFFMAN TM, KIRBY SL, SHERIDAN JF, PRAGNELL IB, SMITHIES O (1995) Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 269:1583-1585.

CORDER EH, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, SMALL GW, ROSES AD, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-23.

CORREALE J, VILLA A (2004) The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 251:1304-1316.

DASH PK, ORSI SA, MOORE AN (2005) Sequestration of serum response factor in the hippocampus impairs long-term spatial memory. *J Neurochem* 93:269-278.

DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, VANDERSTICHELE H, GUHDE G, ANNAERT W, VON FIGURA K, VAN LEUVEN F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.

DHEEN ST, KAUR C, LING EA (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14:1189-1197.

DEL PRETE A, VERMI W, DANDER E, OTERO K, BARBERIS L, LUINI W, BERNASCONI S, SIRONI M, SANTORO A, GARLANDA C, FACCHETTI F, WYMAN MP, VECCHI A, HIRSCH E, MANTOVANI A, SOZZANI S (2004) Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J* 23:3505-3515.

DENG H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SCHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.

DEWITT DA, PERRY G, COHEN M, DOLLER C, SILVER J (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 149: 329-340.

D'HOOGE R, DE DEYN PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60-90.

DICKSON DW (1997) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18:S21-S26.

DIMATTIA BD, KESNER RP (1988) Spatial cognitive maps: differential role of parietal cortex and hippocampal formation. *Behav Neurosci* 102:471-480.

DINELEY KT, WESTERMAN M, BUI D, BELL K, ASHE KH, SWEATT JD (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125-4133.

DRESES-WERRINGLOER U, LAMBERT JC, VINGTDEUX V, ZHAO H, VAIS H, SIEBERT A, JAIN A, KOPPEL J, ROVELET-LECRUX A, HANNEQUIN D, PASQUIER F, GALIMBERTI D, SCARPINI E, MANN D, LENDON C, CAMPION D, AMOUYEL P, DAVIES P, FOSKETT JK, CAMPAGNE F, MARAMBAUD P (2008) A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* 133:1149-1161.

EBERHARDT W, KUNZ D, HUMMEL R, PFEILSCHIFTER J (1996) Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 223:752-756.

EBERT U, KIRCH W (1998) Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest* 28:944-949.

ECKMAN EA, WATSON M, MARLOW L, SAMBAMURTI K, ECKMAN CB (2003) Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 278:2081-2084.

EL KHOURY J, HICKMAN SE, THOMAS CA, CAO L, SILVERSTEIN SC, LOIKE JD (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382:716-719.

EL KHOURY JB, MOORE KJ, MEANS TK, LEUNG J, TERADA K, TOFT M, FREEMAN MW, LUSTER AD (2003) CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med* 197:1657-1666.

EL KHOURY J, TOFT M, HICKMAN SE, MEANS TK, TERADA K, GEULA C, LUSTER AD (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13:432-438.

ENG LF, GHIRNIKAR RS, LEE YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-1451.

ESTUS S, TUCKER HM, VAN ROOYEN C, WRIGHT S, BRIGHAM EF, WOGULIS M, RYDEL RE (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 17:7736-7745.

FARFARA D, LIFSHITZ V, FRENKEL D (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 12:762-780.

FARRIS W, MANSOURIAN S, CHANG Y, LINDSLEY L, ECKMAN EA, FROSCHE MP, ECKMAN CB, TANZI RE, SELKOE DJ, GUENETTE S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4162-4167.

FERNÁNDEZ-VIZARRA P, FERNÁNDEZ AP, CASTRO-BLANCO S, ENCINAS JM, SERRANO J, BENTURA ML, MUÑOZ P, MARTÍNEZ-MURILLO R, RODRIGO J (2004) Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 15:287-305.

FERRER I, SEGUÍ J, PLANAS AM (1996) Amyloid deposition is associated with c-Jun expression in Alzheimer's disease and amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22:521-526.

FIALA M, ZHANG L, GAN X, SHERRY B, TAUB D, GRAVES MC, HAMA S, WAY D, WEINAND M, WITTE M, LORTON D, KUO YM, ROHER AE (1998) Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Mol Med* 4:480-489.

FOSTER FM, TRAER CJ, ABRAHAM SM, FRY MJ (2003) The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 116:3037-3040.

FOUGERAT A, GAYRAL S, GOURDY P, SCHAMBOURG A, RÜCKLE T, SCHWARZ MK, ROMMEL C, HIRSCH E, ARNAL JF, SALLES JP, PERRET B, BRETON-DOUILLON M, WYMANN MP, LAFFARGUE M (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation* 117:1310-1317.

FRANKLIN KBJ, PAXINOS G (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, USA.

GAMES D, ADAMS D, ALESSANDRINI R, BARBOUR R, BERTHELETTE P, BLACKWELL C, CARR T, CLEMENS J, DONALDSON T, GILLESPIE F, GUIDO T, HAGOPIAN S, JOHNSON-WOOD K, KHAN K, LEE M, LEIBOWITZ P, LIEBERBURG I, LITTLE S, MASLIAH E, MCCONLOGUE L, MONTOYA-ZAVALA M, MUCKE L, PAGANINI L, PENNIMAN E, POWER M, SCHENK D, SEUBERT P, SNYDER B, SORIANO F, TAN H, VITALE J, WADSWORTH S, WOLOZIN B, ZHAO J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.

GANDY S (2005) The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115:1121-1129.

GANJU RK, BRUBAKER SA, MEYER J, DUTT P, YANG Y, QIN S, NEWMAN W, GROOPMAN JE (1998) The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273:23169-23175.

GARG A, AGGARWAL BB (2002) Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 16:1053-1068.

GHOSH S, KARIN M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109:S81-S96.

GIOVANNINI MG, SCALI C, PROSPERI C, BELLUCCI A, VANNUCCHI MG, ROSI S, PEPEU G, CASAMENTI F (2002) Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 11:257-274.

GIRI RK, RAJAGOPAL V, SHAHI S, ZLOKOVIC BV, KALRA VK (2005) Mechanism of amyloid peptide induced CCR5 expression in monocytes and its inhibition by siRNA for Egr-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C264-276.

GLENNER GG, WONG CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.

GOEDERT M, SPILLANTINI MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-81.

GOEDERT M, SPILLANTINI MG, CAIRNS NJ, CROWTHER RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159-168.

GOLDMAN DW, CHANG FH, GIFFORD LA, GOETZL EJ, BOURNE HR (1985) Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 162:145-56.

GÓMEZ-MOUTÓN C, LACALLE RA, MIRA E, JIMÉNEZ-BARANDA S, BARBER DF, CARRERA AC, MARTÍNEZ-A C, MAÑES S (2004) Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 164:759-768.

GORELICK PB (2004) Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke* 35:2620-2622.

GÖTZ J, ITTNER LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532-544.

GUZOWSKI JF, MCGAUGH JL (1997) Antisense oligodeoxynucleotide mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2693-2698.

HAASS C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488.

HAASS C, SCHLOSSMACHER MG, HUNG AY, VIGO-PELFREY C, MELLON A, OSTASZEWSKI BL, LIEBERBURG I, KOO EH, SCHENK D, TELOW DB, SELKOE DJ (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.

HAASS C, SELKOE DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.

HARDY J, SELKOE DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.

HARDY JA, HIGGINS GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.

HARKANY T, O'MAHONY S, KELLY JP, SOÓS K, TÖRÖ I, PENKE B, LUITEN PG, NYAKAS C, GULYA K, LEONARD BE (1998) Beta-amyloid(Phe(SO₃H)₂₄)₂₅₋₃₅ in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav Brain Res* 90:133-145.

HENEKA MT, WIESINGER H, DUMITRESCU-OZIMEK L, RIEDERER P, FEINSTEIN DL, KLOCKGETHER T (2001) Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:906-916.

HESELTINE PN, GOODKIN K, ATKINSON JH, VITIELLO B, ROCHON J, HEATON RK, EATON EM, WILKIE FL, SOBEL E, BROWN SJ, FEASTER D, SCHNEIDER L, GOLDSCHMIDTS WL, STOVER ES (1998) Randomized double-blind placebo-controlled trial of peptide T for HIV-associated cognitive impairment. *Arch Neurol* 55:41-51.

HICKEY WF, KIMURA H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.

HICKMAN SE, ALLISON EK, EL KHOURY J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28:8354-8360.

HIRSCH E, KATANAEV VL, GARLANDA C, AZZOLINO O, PIROLA L, SILENGO L, SOZZANI S, MANTOVANI A, ALTRUDA F, WYMAN MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287:1049-1053.

HO L, PIERONI C, WINGER D, PUROHIT DP, AISEN PS, PASINETTI GM (1999) Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 57:295-303.

HOOZEMANS JJ, ROZEMULLER AJ, JANSSEN I, DE GROOT CJ, VEERHUIS R, EIKELENBOOM P (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol* 101:2-8.

HORUK R, MARTIN AW, WANG Z, SCHWEITZER L, GERASSIMIDES A, GUO H, LU Z, HESSELGESSER J, PEREZ HD, KIM J, PARKER J, HADLEY TJ, PEIPER SC (1997) Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* 158:2882-2890.

HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, ECKMAN C, HARIGAYA Y, YOUNKIN S, YANG F, COLE G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.

HÜLL M, MÜKSCH B, AKUNDI RS, WASCHBISCH A, HOOZEMANS JJ, VEERHUIS R, FIEBICH BL (2006) Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem Int* 48:663-672.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2000) Censo Demográfico, 2000. Rio de Janeiro: IBGE.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2008) Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade: 1980-2050 - Revisão 2008. Rio de Janeiro: IBGE.

ISHIZUKA K, KIMURA T, IGATA-YI R, KATSURAGI S, TAKAMATSU J, MIYAKAWA T (1997) Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 51:135-138.

IWATA N, TSUBUKI S, TAKAKI Y, SHIROTANI K, LU B, GERARD NP, GERARD C, HAMA E, LEE HJ, SAIDO TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550-1552.

IWATSUBO T (2000) Amyloid deposits and plaque formation. Cap. 10, p. 147-156, In: *Neurodegenerative dementias. Clinical features and pathological mechanisms*. McGraw-Hill, New York, USA.

JANG JH, SURH YJ (2005) AP-1 mediates beta-amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1421-1428.

JIANG H, KUANG Y, WU Y, SURCKA A, SIMON MI, WU D (1996) Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J Biol Chem* 271:13430-13434

JIANG Y, SALAFRANCA MN, ADHIKARI S, XIA Y, FENG L, SONNTAG MK, DEFIEBRE CM, PENNELL NA, STREIT WJ, HARRISON JK (1998) Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 86:1-12.

JOHNSTONE M, GEARING AJ, MILLER KM (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93:182-193.

JONES SA, MOSER B, THELEN M (1995) A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). *FEBS Lett* 364:211-214.

KALTSCHMIDT B, NDIAYE D, KORTE M, POTHION S, ARBIBE L, PRÜLLAGE M, PFEIFFER J, LINDECKE A, STAIGER V, ISRAËL A, KALTSCHMIDT C, MÉMET S (2006) NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* 26:2936-2946.

KALTSCHMIDT B, UHEREK M, VOLK B, BAEUERLE PA, KALTSCHMIDT C (1997) Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2642-2647.

KALTSCHMIDT B, WIDERA D, KALTSCHMIDT C (2005) Signaling via NFkappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1745:287-299.

KAMINSKA B, PYRZYNSKA B, CIECHOMSKA I, WISNIEWSKA M (2000) Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp* 60:395-402.

KANG DE, SAITOH T, CHEN X, XIA Y, MASLIAH E, HANSEN LA, THOMAS RG, THAL LJ, KATZMAN R (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein

receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 49:56-61.

KARIN M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.

KARIN M, BEN-NERIAH Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.

KARIN M, LIU Z, ZANDI E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.

KARIN M, YAMAMOTO Y, WANG QM (2004) The IKK NF-kappaB system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3:17-26.

KENNEDY JL, FARRER, LA, ANDREASEN NC, MAYEUX R, ST GEORGE-HYSLOP P (2003) The genetics of adult-onset neuropsychiatric disease: Complexities and conundra? *Science* 302:822-826.

KIM DH, JEON SJ, SON KH, JUNG JW, LEE S, YOON BH, LEE JJ, CHO YW, CHEONG JH, KO KH, RYU JH (2007) The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurobiol Learn Mem* 87:536-546.

KIM DH, KIM S, JEON SJ, SON KH, LEE S, YOON BH, CHEONG JH, KO KH, RYU JH (2008) The effects of acute and repeated oroxylin A treatments on Abeta(25-35)-induced memory impairment in mice. *Neuropharmacology* 55:639-647.

KIM Y, FISCHER SM (1998) Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem* 273:27686-27694.

KLEIN RS, WILLIAMS KC, ALVAREZ-HERNANDEZ X, WESTMORELAND S, FORCE T, LACKNER AA, LUSTER AD (1999) Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Immunol* 163:1636-1646.

KLEINERT H, PAUTZ A, LINKER K, SCHWARZ PM (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500:255-266.

KOLSON DL, LAVI E, GONZÁLEZ-SCARANO F (1998) The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system. *Adv Virus Res* 50:1-47.

KOPPAL T, DRAKE J, YATIN S, JORDAN B, VARADARAJAN S, BETTENHAUSEN L, BUTTERFIELD DA (1999) Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:310-317.

KREUTZBERG, GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

- KUZIEL WA, DAWSON TC, QUINONES M, GARAVITO E, CHENAUX G, AHUJA SS, REDDICK RL, MAEDA N (2003) CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis* 167:25-32.
- KYRIAKIS JM, AVRUCH J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869.
- LAFERLA FM, ODDO S (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.
- LAMBERT JC, AMOUYEL P (2007) Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* 32:S62–S70.
- LAMBERT MP, BARLOW AK, CHROMY BA, EDWARDS C, FREED R, LIOSATOS M, MORGAN TE, ROZOVSKY I, TROMMER B, VIOLA KL, WALS P, ZHANG C, FINCH CE, KRAFFT GA, KLEIN WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448-6453.
- LAMMICH S, KOJRO E, POSTINA R, GILBERT S, PFEIFFER R, JASIONOWSKI M, HAASS C, FAHRENHOLZ F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3922-3927.
- LAURSEN SE, BELKNAP JK (1986) Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 16:355–357.
- LEE MM, BADACHE A, DEVRIES GH (1999) Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res* 55:702-712.
- LEISSRING MA, FARRIS W, CHANG AY, WALSH DM, WU X, SUN X, FROSC MP, SELKOE DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087–1093.
- LI Q, VERMA IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734.
- LI Z, JIANG H, XIE W, ZHANG Z, SMRCKA AV, WU D (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287:1046-1049.
- LIANG X, WANG Q, HAND T, WU L, BREYER RM, MONTINE TJ, ANDREASSON K (2005) Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:10180-10187.
- LIANG Z, LIU F, GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K, GONG CX (2007) Downregulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 103:2462-2470.

LIN CH, YEH SH, LIN CH, LU KT, LEU TH, CHANG WC, GEAN PW (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdale. *Neuron* 31:841–851.

LIU JX, CAO X, TANG YC, LIU Y, TANG FR (2007) CCR7, CCR8, CCR9 and CCR10 in the mouse hippocampal CA1 area and the dentate gyrus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neurochem* 100:1072-1088.

LIU SJ, ZHANG AH, LI HL, WANG Q, DENG HM, NETZER WJ, XU H, WANG JZ (2003) Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem* 87:1333–1344.

LONZE BE, GINTY DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.

LUE LF, RYDEL R, BRIGHAM EF, YANG LB, HAMPEL H, MURPHY GM JR, BRACHOVA L, YAN SD, WALKER DG, SHEN Y, ROGERS J (2001). Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35:72-9.

LUPIA E, GOFFI A, DE GIULI P, AZZOLINO O, BOSCO O, PATRUCCO E, VIVALDO MC, RICCA M, WYMAN MP, HIRSCH E, MONTRUCCHIO G, EMANUELLI G (2004) Ablation of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces the severity of acute pancreatitis. *Am J Pathol* 165:2003-2011.

LUSTER AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.

MALEK S, CHEN Y, HUXFORD T, GHOSH G (2001) I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276:45225–45233.

MANDER P, BROWN GC (2005) Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 12:2-20.

MARELLA M, CHABRY J (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620-627.

MARKESBERY WR (1997) Neuropathological criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18:S13-S19.

MASLIAH E, ACHIM CL, GE N, DETERESA R, TERRY RD, WILEY CA (1992) Spectrum of human immunodeficiency virus-associated neocortical damage. *Ann Neurol* 32:321-329.

MASLIAH E, TERRY RD, ALFORD M, DETERESA RM (1990) Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: An alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38:837-844.

MASTERS CL, SIMMS G, WEINMAN NA, MULTHAUP G, MCDONALD BL, BEYREUTHER K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4245-4249.

MATTSON MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.

MAURER K, VOLK S, GERBALDO H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.

MAYEUX R (2003) Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:81-104.

MCGEER PL, MCGEER EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res Rev* 21:195-218.

MCGEER PL, MCGEER EG (2001) Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 22:799-809.

MCGEER PL, MCGEER EG (2002) Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 8: 529-538.

MCGEER PL, MCGEER EG (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28:639-647.

MCGEER PL, SCHULZER M, MCGEER EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425-32.

MCKHANN G, DRACHMAN D, FOLSTEIN M, KATZMAN R, PRICE D, STADLAN EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under auspices of the department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34:939-944.

MCLAURIN J, CECAL R, KIERSTEAD ME, TIAN X, PHINNEY AL, MANEA M, FRENCH JE, LAMBERMON MH, DARABIE AA, BROWN ME, JANUS C, CHISHTI MA, HORNE P, WESTAWAY D, FRASER PE, MOUNT HT, PRZYBYLSKI M, ST GEORGE-HYSLOP P (2002) Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8:1263-1269.

MCMANUS C, BERMAN JW, BRETT FM, STAUNTON H, FARRELL M, BROSANAN CF (1998) MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol* 86:20-29.

MEDA L, BARON P, PRAT E, SCARPINI E, SCARLATO G, CASSATELLA MA, ROSSI F (1999) Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]. *J Neuroimmunol* 93:45-52.

MEDAWAR PB (1948) Immunity to homologous grafted skin: III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29:58–69.

MEDEIROS R, PREDIGER RD, PASSOS GF, PANDOLFO P, DUARTE FS, FRANCO JL, DAFRE AL, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, TAKAHASHI RN, CAMPOS MM, CALIXTO JB (2007) Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* 27:5394-5404.

MEFFERT MK, BALTIMORE D (2005) Physiological functions for brain NF- κ B. *Trends Neurosci* 28:37–43.

MEFFERT MK, CHANG JM, WILTGEN BJ, FANSELOW MS, BALTIMORE D (2003) NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072-1078.

MELLADO M, RODRÍGUEZ-FRADE JM, MAÑES S, MARTÍNEZ-A C (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19:397-421.

MÉMET S (2006) NF- κ B functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* 72:1180-1195.

MENNICKEN F, MAKI R, DE SOUZA EB, QUIRION R (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 20:73-78.

MILLER G (2005) Neuroscience. The dark side of glia. *Science*. 308:778-781.

MIRRA SS, HEYMAN A, MCKEEL D, SUMI SM, CRAIN BJ, BROWNLEE LM, VOGEL FS, HUGHES JP, VAN BELLE G, BERG L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486.

MOLLER HJ, GRAEBER MB (1998) The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248:111–122.

MONTINE TJ, SIDELL KR, CREWS BC, MARKESBERY WR, MARNETT LJ, ROBERTS LJ 2ND, MORROW JD (1999) Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology* 53:1495-1498.

MOORE AH, O'BANION MK (2002) Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1627–1656.

MORISHIMA Y, GOTOH Y, ZIEG J, BARRETT T, TAKANO H, FLAVELL R, DAVIS RJ, SHIRASAKI Y, GREENBERG ME (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551-7560.

MORRIS JC, RUBIN EH (1991) Clinical diagnosis and course of Alzheimer's disease. *Psychiatr Clin North Am* 14:223–236.

- MORRIS RGM, GARRUD P, RAWLINS JNP, O'KEEFE J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- MORTIMER JA, EBBITT B, JUN SP, FINCH MD (1992) Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* 42:1689-1696.
- MOUNT C, DOWNTON C (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med* 12:780-784.
- MÜLLER T, MEYER HE, EGENSEPERGER R, MARCUS K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393-406.
- MURPHY PM (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12:593-633.
- MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HEBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, MILLER LH, OPPENHEIM JJ, POWER CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.
- NAG S, YEE BK, TANG F (1999) Chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) results in a selective loss of neuropeptides in addition to a reduction in choline acetyltransferase activity in the cortical mantle and hippocampus in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 897:420-422.
- NAKAMURA S, MURAYAMA N, NOSHITA T, ANNOURA H, OHNO T (2001) Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain Res* 912:128-136.
- NALIVAEVA NN, FISK LR, BELYAEV ND, TURNER AJ (2008) Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5:212-224.
- NATHAN C, CALINGASAN N, NEZEZON J, DING A, LUCIA MS, LA PERLE K, FUORTES M, LIN M, EHRT S, KWON NS, CHEN J, VODOVOTZ Y, KIPANI K, BEAL MF (2005) Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 202:1163-1169.
- NGUYEN MD, JULIEN JP, RIVEST S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216-227.
- NIA (National Institute on Aging) (2007) *Why Population Aging Matters: A Global Perspective*. Bethesda: NIA.
- O'NEILL LA, KALTSCHMIDT C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.
- OPPERMANN M (2004) Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16:1201-1210

PAHL HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853–6866.

PASINETTI GM, AISEN PS (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87: 319-324.

PASTOR P, GOATE AM (2004) Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Curr. Psychiatry Rep* 6:125–133.

PETRELLA JR, COLEMAN RE, DORAISWAMY PM (2003) Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future. *Radiology* 226:315-336.

POIRIER J (2005) Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26:355-361.

PREDIGER RD, FRANCO JL, PANDOLFO P, MEDEIROS R, DUARTE FS, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, FARINA M, CALIXTO JB, TAKAHASHI RN, DAFRE AL (2007) Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res* 177:205-213.

PREDIGER RD, MEDEIROS R, PANDOLFO P, DUARTE FS, PASSOS GF, PESQUERO JB, CAMPOS MM, CALIXTO JB, TAKAHASHI RN (2008) Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151:631-643.

RANSOHOFF RM, TANI M, GLABINSKI AR, CHERNOSKY A, KRIVACIC K, PETERSON JW, CHIEN HF, TRAPP BD (1997) Chemokines and chemokine receptors in model neurological pathologies: molecular and immunocytochemical approaches. *Methods Enzymol* 287:319-348.

REBENKO-MOLL NM, LIU L, CARDONA A, RANSOHOFF RM (2006) Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol* 18:683-689.

REDMOND L, KASHANI AH, GHOSH A (2002) Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34: 999-1010.

REIF K, OKKENHAUG K, SASAKI T, PENNINGER JM, VANHAESEBROECK B, CYSTER JG (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173:2236-2240.

RITCHIE CW, BUSH AI, MACKINNON A, MACFARLANE S, MASTWYK M, MACGREGOR L, KIERS L, CHERNY R, LI QX, TAMMER A, CARRINGTON D, MAVROS C, VOLITAKIS I, XILINAS M, AMES D, DAVIS S, BEYREUTHER K, TANZI RE, MASTERS CL (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60:1685–1691.

RITCHIE K, LOVESTONE S (2002) The dementias. *Lancet* 360:1759-1766.

ROBERSON ED, MUCKE L (2006) 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 314:781-784.

ROGERS J, KIRBY LC, HEMPELMAN SR, BERRY DL, MCGEER PL, KASZNIAK AW, ZALINSKI J, COFIELD M, MANSUKHANI L, WILLSON P et al (1993) Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1609-1611.

ROGERS J, LUE LF (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39:333-340.

ROLLINS BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90:909-928.

ROMANELLI MF, MORRIS JC, ASHKIN K, COBEN LA (1990) Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch Neurol* 47:847-850.

ROMMEL C, CAMPS M, JI H (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* 7:191-201.

ROSI S, PERT CB, RUFF MR, MCGANN-GRAMLING K, WENK GL (2005) Chemokine receptor 5 antagonist D-Ala-peptide T-amide reduces microglia and astrocyte activation within the hippocampus in a neuroinflammatory rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 134:671-676.

ROTHWARF DM, KARIN M (1999) The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* RE1.

ROTTMAN JB, GANLEY KP, WILLIAMS K, WU L, MACKAY CR, RINGLER DJ (1997) Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am J Pathol* 151:1341-1351.

ROYCHAUDHURI R, YANG M, HOSHI MM, TELOW DB (2009) Amyloid {beta}-Protein Assembly and Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 284:4749-4753.

RUCKLE T, JIANG X, GAILLARD P, CHURCH D, VALLOTTON T (2004a) Azolidinone-vinyl fused-benzene derivatives. World patent WO2004007491 (Applied Research Systems Ars Holding N.V.).

RUCKLE T, SCHWARZ MK, ROMMEL C (2006) PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nat Rev Drug Discov* 5:903-918.

RUCKLE T, VALLOTTON T, GAILLARD P, CHURCH D, JIANG X (2004b) Azolidinone-vinyl fused-benzene derivatives. US patent US20040092561.

SAMSON M, LABBE O, MOLLEREAU C, VASSART G, PARMENTIER M (1996) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362-3367.

SANTAMBROGIO L, BELYANSKAYA SL, FISCHER FR, CIPRIANI B, BROSNAN CF, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, STERN LJ, STROMINGER JL, RIESE R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6295-6300.

SASAKI T, IRIE-SASAKI J, JONES RG, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, STANFORD WL, BOLON B, WAKEHAM A, ITIE A, BOUCHARD D, KOZIERADZKI I, JOZA N, MAK TW, OHASHI PS, SUZUKI A, PENNINGER JM (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287:1040-1046.

SCHENK D, BARBOUR R, DUNN W, GORDON G, GRAJEDA H, GUIDO T, HU K, HUANG J, JOHNSON-WOOD K, KHAN K, KHOLODENKO D, LEE M, LIAO Z, LIEBERBURG I, MOTTER R, MUTTER L, SORIANO F, SHOPP G, VASQUEZ N, VANDEVERT C, WALKER S, WOGULIS M, YEDNOCK T, GAMES D, SEUBERT P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.

SCHWAB C, MCGEER PL (2008) Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 13:359-369.

SELKOE DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.

SELKOE DJ (2000) Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann NY Acad Sci* 924:17-25.

SELKOE DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.

SELKOE DJ (2002) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.

SELLEBJERG F, MADSEN HO, JENSEN CV, JENSEN J, GARRED P (2000) CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 102:98-106.

SHAULIAN E, KARIN M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131-E136.

SHOJI M, GOLDE TE, GHISO J, CHEUNG TT, ESTUS S, SHAFFER LM, CAI XD, MCKAY DM, TINTNER R, FRANGIONE B, et al (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126-129.

SIMARD AR, SOULET D, GOWING G, JULIEN JP, RIVEST S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49:489-502.

SIMMONS DL, BOTTING RM, HLA T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387-437.

SIMPSON JE, NEWCOMBE J, CUZNER ML, WOODROOFE MN (1998) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 84: 238-249.

SŁOMNICKI LP, LEŚNIAK W (2008) A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiol Exp* 68:219-228.

SOTSIOS Y, WHITTAKER GC, WESTWICK J, WARD SG (1999) The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 163:5954-5963.

SOULET D, RIVEST S (2008) Microglia. *Curr Biol* 18:506-508.

STEWART WF, KAWAS C, CORRADA M, METTER EJ (1997) Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48:626-32.

STRITTMATTER WJ, SAUNDERS AM, SCHMECHEL D, PERICAK-VANCE M, ENGHILD J, SALVESEN GS, ROSES AD (1993) Apolipoprotein E: Highavidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977-1981.

STURCHLER-PIERRAT C, ABRAMOWSKI D, DUKE M, WIEDERHOLD KH, MISTL C, ROTHACHER S, LEDERMANN B, BÜRKI K, FREY P, PAGANETTI PA, WARIDEL C, CALHOUN ME, JUCKER M, PROBST A, STAUFENBIEL M, SOMMER B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13287-13292.

SUN Z, ANDERSSON R (2002) NF- κ B activation and inhibition: a review. *Shock* 18: 99-106.

TAK PP, FIRESTEIN GS (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107:7-11.

TANZI RE, MOIR RD, WAGNER SL (2004) Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43:605-608.

TERAI K, MATSUO A, MCGEER PL (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res* 735:159-168.

TERI L, BORSON S, KIYAK HA, YAMAGISHI M (1989) Behavioral disturbance, cognitive dysfunction, and functional skill. Prevalence and relationship in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 37:109-116.

THELEN M, UGUCCIONI M, BOSIGER J (1995) PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 217:1255-1262.

THOMAS MJ, SMITH A, HEAD DH, MILNE L, NICHOLLS A, PEARCE W, VANHAESEBROECK B, WYMAN MP, HIRSCH E, TRIFILIEFF A, WALKER C, FINAN P, WESTWICK J (2005) Airway inflammation: chemokine-induced neutrophilia and the class I phosphoinositide 3-kinases. *Eur J Immunol* 35:1283-1291.

TILTON B, HO L, OBERLIN E, LOETSCHER P, BALEUX F, CLARK-LEWIS I, THELEN M (2000) Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal

cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 192:313-324.

TOGO T, AKIYAMA H, ISEKI E, KONDO H, IKEDA K, KATO M, ODA T, TSUCHIYA K, KOSAKA K (2002) Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 124:83-92.

TOHDA C, NAKANISHI R, KADOWAKI M (2007) Learning deficits and agenesis of synapses and myelinated axons in phosphoinositide-3 kinase-deficient mice. *Neurosignals* 15:293-306.

TOLEDANO A, ALVAREZ MI (2004) Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Curr Alzheimer Res* 1:189-214.

TOMLINSON BE, BLESED G, ROTH M (1970) Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* 11:205-242.

TOWN T, LAOUAR Y, PITTENGER C, MORI T, SZEKELY CA, TAN J, DUMAN RS, FLAVELL RA (2008) Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med* 14:681-687.

TOWN T, NIKOLIC V, TAN J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 24:1-10.

TOWNSEND M, SHANKAR GM, MEHTA T, WALSH DM, SELKOE DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477-492.

TROY CM, RABACCHI SA, XU Z, MARONEY AC, CONNORS TJ, SHELANSKI ML, GREENE LA (2001) beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun Nterminal kinase activation. *J Neurochem* 77:157-164.

TSATSANIS C, ANDROULIDAKI A, VENIHAKI M, MARGIORIS AN (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1654-1661.

TUPPO EE, ARIAS HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.

TURNER AJ, FISK L, NALIVAEVA NN (2004) Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1035:1-20.

TURNER L, WARD SG, WESTWICK J (1995) RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* 155: 2437-2444.

VAN DAM D, DE DEYN PP (2006) Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5:956-970.

VAN DER MEER P, ULRICH AM, GONZÁLEZ-SCARANO F, LAVI E (2000) Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol* 69:192-201.

VANHAESEBROECK B, LEEVERS SJ, AHMADI K, TIMMS J, KATSO R, DRISCOLL PC, WOSCHOLSKI R, PARKER PJ, WATERFIELD MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535-602.

VASSAR R, BENNETT BD, BABU-KHAN S, KAHN S, MENDIAZ EA, DENIS P, TELOW DB, ROSS S, AMARANTE P, LOELOFF R, LUO Y, FISHER S, FULLER J, EDENSON S, LILE J, JAROSINSKI MA, BIERE AL, CURRAN E, BURGESS T, LOUIS JC, COLLINS F, TREANOR J, ROGERS G, CITRON M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.

VERBEEK MM, OTTE-HOLLER I, WESSELING P, VAN NOSTRAND WE, SORG C, RUITER DJ, DE WAAL RM (1995) A lysosomal marker for activated microglial cells involved in Alzheimer classic senile plaques. *Acta Neuropathol* 90:493-503.

VILA-CORO AJ, RODRÍGUEZ-FRADE JM, MARTÍN DE ANA A, MORENO-ORTÍZ MC, MARTÍNEZ AC, MELLADO M (1999) The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13:1699-1710.

VIOLA A, LUSTER AD (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:171-197.

VOLTERRA A, MELDOLESI J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.

WALKER DG, LUE LF, BEACH TG (2001) Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiol Aging* 22:957-966.

WALSH DM, KLYUBIN I, FADEEVA JV, CULLEN WK, ANWYL R, WOLFE MS, ROWAN MJ, SELKOE DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.

WALSH DM, SELKOE DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.

WALSH JS, WELCH HG, LARSON EB (1990) Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Ann Intern Med* 113:429-434.

WANG D, RICHMOND A (2001) Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:3650-3659.

WANG XP, DING HL (2008) Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull* 24:105-109.

WARNER TD, MITCHELL JA (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* 18:790-804.

WEISS-HALJITI C, PASQUALI C, JI H, GILLIERON C, CHABERT C, CURCHOD ML, HIRSCH E, RIDLEY AJ, HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN R, CAMPS M, ROMMEL C (2004) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *J Biol Chem* 279:43273-43284.

WEKERLE H, LINNINGTON C, LASSMANN H, MEYERMANN R (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9:271-277.

WEKERLE H, SUN D, OROPEZA-WEKERLE RL, MEYERMANN R (1987) Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132:43-57.

WESTMORELAND SV, ROTTMAN JB, WILLIAMS KC, LACKNER AA, SASSEVILLE VG (1998) Chemokine receptor expression on resident and inflammatory cells in the brain of macaques with simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol* 152: 659-665.

WETZKER R, ROMMEL C (2004) Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des* 10:1915-1922.

WHITESIDE ST, ISRAEL A (1997) I κ B proteins—structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8:75-82.

WOLFE MS, XIA W, OSTASZEWSKI BL, DIEHL TS, KIMBERLY WT, SELKOE DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517.

WONG M, UDDIN S, MAJCHRZAK B, HUYNH T, PROUDFOOT AE, PLATANIAS LC, FISH EN (2001) Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J Biol Chem* 276:11427-11431.

WONG MM, FISH EN (2003) Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15:5-14.

WYSS-CORAY T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12:1005-1015.

WYSS-CORAY T, LIN C, YAN F, YU GQ, ROHDE M, MCCONLOGUE L, MASLIAH E, MUCKE L (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 7:612-618.

WYSS-CORAY T, LOIKE JD, BRIONNE TC, LU E, ANANKOV R, YAN F, SILVERSTEIN SC, HUSEMANN J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.

WYSS-CORAY T, MUCKE L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.

WYSS-CORAY T, YAN F, LIN AH, LAMBRIS JD, ALEXANDER JJ, QUIGG RJ, MASLIAH E (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10837-10842.

XIA M, HYMAN BT (2002) GROalpha/KC, a chemokine receptor CXCR2 ligand, can be a potent trigger for neuronal ERK1/2 and PI-3 kinase pathways and for tau hyperphosphorylation-a role in Alzheimer's disease? *J Neuroimmunol* 122:55-64.

XIA MQ, BACSKAI BJ, KNOWLES RB, QIN SX, HYMAN BT (2000) Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 108:227-235.

XIA MQ, QIN SX, WU LJ, MACKAY CR, HYMAN BT (1998) Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am J Pathol* 153:31-37.

XIANG Z, HO L, YEMUL S, ZHAO Z, QING W, POMPL P, KELLEY K, DANG A, QING W, TELOW D, PASINETTI GM (2002) Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Gene Expr* 10:271-278.

XING J, KORNHAUSER JM, XIA Z, THIELE EA, GREENBERG ME (1998) Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18:1946-1955.

XU J, CHEN S, AHMED SH, CHEN H, KU G, GOLDBERG MP, HSU CY (2001) Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci* 21:RC118.

YAMAMOTO M, KIYOTA T, WALSH SM, LIU J, KIPNIS J, IKEZU T (2008) Cytokine-mediated inhibition of fibrillar amyloid-beta peptide degradation by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 181:3877-3886.

YAMAMOTO-SASAKI M, OZAWA H, SAITO T, ROSLER M, RIEDERER P (1999) Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 824:300-303.

YAN JJ, CHO JY, KIM HS, KIM KL, JUNG JS, HUH SO, SUH HW, KIM YH, SONG DK (2001) Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 133:89-96.

YAN P, HU X, SONG H, YIN K, BATEMAN RJ, CIRRITO JR, XIAO Q, HSU FF, TURK JW, XU J, HSU CY, HOLTZMAN DM, LEE JM (2006) Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* 281:24566 –24574.

YANKNER BA, LU T (2009) Amyloid {beta}-Protein Toxicity and the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 284:4755-4759.

YUM HK, ARCAROLI J, KUPFNER J, SHENKAR R, PENNINGER JM, SASAKI T, YANG KY, PARK JS, ABRAHAM E (2001) Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury. *J Immunol* 167:6601-6608.

ZANDI PP, ANTHONY JC, HAYDEN KM, MEHTA K, MAYER L, BREITNER JC (2002) Cache County Study Investigators. Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology* 59:880-886.

ZLOTNIK A, YOSHIE O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.

ANEXOS

PUBLICAÇÕES

Parte dos resultados da presente dissertação está submetida à publicação em:

PASSOS GF, FIGUEIREDO CP, PREDIGER RDS, PANDOLFO P, DUARTE FS, MEDEIROS R, CALIXTO JB. Glial cell activation mediated by chemokine MIP-1 α /CCR5 signaling pathway is essential for β -amyloid-induced neuroinflammation and cognitive deficits *in vivo*. (Manuscrito submetido ao periódico *American Journal of Pathology*).

PASSOS GF, FIGUEIREDO CP, PREDIGER RDS, DUARTE FS, LEAL PC, MEDEIROS R, CALIXTO JB. Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by β -amyloid 1-40 peptide in mice. (Manuscrito submetido ao periódico *Neuroscience*).

Outros trabalhos desenvolvidos durante o doutorado:

HARA DB, LEITE DF, FERNANDES ES, **PASSOS GF**, GUIMARÃES AO, PESQUERO JB, CAMPOS MM, CALIXTO JB (2008) The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 154:1276-1286.

MEDEIROS R, RODRIGUES GB, FIGUEIREDO CP, RODRIGUES EB, GRUMMAN A JR, MENEZES-DE-LIMA O JR, **PASSOS GF**, CALIXTO JB (2008) Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis. *Mol Pharmacol* 74:154-161.

QUINTÃO NL, **PASSOS GF**, MEDEIROS R, PASZCUK AF, MOTTA FL, PESQUERO JB, CAMPOS MM, CALIXTO JB (2008) Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28:2856-2863.

PREDIGER RD, MEDEIROS R, PANDOLFO P, DUARTE FS, **PASSOS GF**, PESQUERO JB, CAMPOS MM, CALIXTO JB, TAKAHASHI RN (2008) Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151:631-643.

FERNANDES ES, **PASSOS GF**, MEDEIROS R, DA CUNHA FM, FERREIRA J, CAMPOS MM, PIANOWSKI LF, CALIXTO JB (2007) Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol* 569:228-236.

MEDEIROS R, PREDIGER RD, **PASSOS GF**, PANDOLFO P, DUARTE FS, FRANCO JL, DAFRE AL, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, TAKAHASHI RN,

CAMPOS MM, CALIXTO JB (2007) Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* 27:5394-5404.

MEDEIROS R, **PASSOS GF**, VITOR CE, KOEPP J, MAZZUCO TL, PIANOWSKI LF, CAMPOS MM, CALIXTO JB (2007) Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol* 151:618-627.

RODRIGUES GB, **PASSOS GF**, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, RODRIGUES EB, GRUMMAN A JR, MEDEIROS R, CALIXTO JB (2007) Preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of systemic and topical thalidomide on endotoxin-induced uveitis in rats. *Exp Eye Res* 84:553-560.

PASSOS GF, FERNANDES ES, DA CUNHA FM, FERREIRA J, PIANOWSKI LF, CAMPOS MM, CALIXTO JB (2007) Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol* 110:323-333.

ROCHA AC, FERNANDES ES, **PASSOS GF**, CALIXTO JB, CAMPOS MM (2005) Assessment of TNFalpha contribution to the functional up-regulation of kinin B(1) receptors in the mouse paw after treatment with LPS. *Int Immunopharmacol* 5:1593-1600.

FERNANDES ES, **PASSOS GF**, CAMPOS MM, DE SOUZA GE, FITTIPALDI JF, PESQUERO JL, TEIXEIRA MM, CALIXTO JB (2005) Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. *Br J Pharmacol* 146:209-216.